

Aus dem Lehrstuhl
für Humangenetik
- Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber -
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Funktionelle Untersuchungen zu Krankheits-assoziierten Mutationen in den Genen ABCA4 und VMD2

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Corinna Aichinger

2012

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernhard Weber
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Herbert Jäggle
Tag der mündlichen Prüfung:	15. März 2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1. Einleitung	1
1.1 Retinales Pigmentepithel und Photorezeptoren des Auges.....	1
1.2 Morbus Stargardt.....	2
1.3 Morbus Best und autosomal dominante	4
Vitreoretinopathia (ADVIRC)	4
1.4 Analyse des Spleißverhaltens mittels <i>in vitro Exon-trapping</i> Analysen.....	6
1.6 Aufgabenstellung.....	9
2. Material	11
2.1 Organismen und Zellen	11
2.2 Primer	11
2.4 Plasmide.....	13
2.4 Enzyme.....	13
2.5 Chemikalien.....	14
2.6 Kits.....	14
2.7 Medien, Puffer und Lösungen.....	15
2.8 Verbrauchsmaterialien.....	16
2.9 Geräte und Software.....	17
3. Methoden	19
3.1 Zellkultur	19
3.1.1 Escherichia coli (E.coli)	19
3.1.2 Cos7-Zelllinie	20
3.2 DNA	20
3.2.1 Polymerase Ketten Reaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR)	20
3.2.2 Aufreinigung von DNA nach PCR	22
3.2.3 Auftrennung und Analyse von DNA.....	22
3.2.4 Gelextraktion von DNA.....	22
3.2.5 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	23
3.2.6 Klonieren von PCR-Produkten	23
3.2.7 Plasmid-DNA-Präparationen.....	24
3.2.8 Restriktionsverdau	24

3.2.9 Sequenzierung	25
3.2.10 <i>Exon-trapping</i>	27
3.3 Transfektion von Cos 7-Zellen	27
3.4 RNA	28
3.4.1 RNA-Isolierung	28
3.4.2 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	29
3.4.3 Reverse Transkription (<i>complementary</i> DNA-Synthese)	29
3.4.4 Reverse Transkription-Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR)	30
3.5 Software	31
3.5.1 BDGP <i>splice site prediction by neural network</i>	31
3.5.2 <i>Splice score calculation</i>	32
3.5.3 ESEfinder 2.0	32
4. Ergebnisse	34
4.1 ABCA4-Mutationen	34
4.1.1 IVS25+9G>C: Keine Auswirkung auf Spleißen <i>in vitro</i>	35
4.1.2 IVS2-1G>A: Deletion einer Base	36
4.1.3 c.6147G>A und IVS40+5G>A: <i>Exon-skipping</i>	37
4.1.4 IVS8+3A>C und IVS10+1G>T: <i>Exon-skipping</i> und Aktivierung einer kryptischen <i>splice site</i>	39
4.1.5 IVS9-5G>A: Verbessertes Spleißen	41
4.1.6 Übersicht über die Ergebnisse des ABCA4-Projektes	42
4.2 VMD2-Mutationen	44
4.2.1 VMD2 Exon 4 Spleißvarianten	45
4.2.2 Veränderungen in <i>exonic splice enhancer</i> -Sequenzen	47
5. Diskussion	50
5.1 ABCA4-Mutationen	50
5.1.1 Analyse der ABCA4-Mutationen von Morbus Stargardt-Patienten	50
5.1.2 Klinische Ausprägung von Morbus Stargardt	53
5.2 VMD2-Mutationen	56
5.2.1 VMD2-Mutationen und Ansätze zur Klärung der Krankheitsentstehung ...	56
5.2.2 Auswirkung von VMD2-Mutationen auf <i>exonic splice enhancer</i>	59
6. Zusammenfassung	61
Literaturverzeichnis	63
Abkürzungsverzeichnis	69

Abbildungsverzeichnis	71
Tabellenverzeichnis	72

1. Einleitung

1.1 Retinales Pigmentepithel und Photorezeptoren des Auges

ABCA4 und VMD2 sind Gene, die im menschlichen Auge exprimiert werden und deren Defekt ursächlich für definierte Augenerkrankungen ist. Das ABCA4-Gen (*ATP-binding cassette, subfamily A, member 4*; OMIM 601691) ist in den Photorezeptoren der Retina, den Stäbchen und Zapfen, aktiv (Allikmets et al., 1997; Molday et al., 2000), während das VMD2-Gen (*vitelliform macular dystrophy type 2*; OMIM 607854) im retinalen Pigmentepithel (RPE) exprimiert wird (Marquardt et al., 1998).

Das RPE befindet sich zwischen Choroidea (Aderhaut) und Stratum nervosum (Sinneszellschicht). Es ist mit der Choroidea über die Bruch'sche Membran fest verbunden, wohingegen das Stratum nervosum nur locker aufliegt, mit Ausnahme von zwei Stellen, an denen beide Schichten verwachsen sind. Das RPE hat vielfältige Aufgaben. So stellt es die Versorgung der Netzhaut über die Aderhaut sicher, wirkt als Schadstofffilter, nimmt Stoffwechselprodukte der Sinneszellschicht auf und dient der Phagozytose abgestoßener Zellmembranteile (Trepel, 2004).

Das Stratum nervosum ist Teil des Gehirns, das in die Peripherie verlagert wurde. Es setzt sich aus neun Schichten zusammen. Darunter befinden sich, direkt dem RPE aufliegend, als primäre Sinneszellen Stäbchen und Zapfen (Welsch, 2003). Stäbchen- und Zapfenzellen sind die Licht wahrnehmenden Zellen, wobei Stäbchen bei Dämmerung und Zapfen bei Tageslicht die Helligkeitswahrnehmung und zusätzlich die Farbwahrnehmung tragen (Trepel, 2004). Ermöglicht wird dies durch Photopigmente in den Membranscheiben (Disci) der Außensegmente dieser Zellen. Das Photopigment der Stäbchen, Rhodopsin, unterscheidet sich vom Zapfenopsin lediglich in wenigen Aminosäuren und besteht aus dem Glykoprotein Opsin, welches aus sieben alpha-Helices und 11-cis-Retinal, einem Vitamin A-Derivat, aufgebaut ist. Bei Absorption von Lichtquanten wird 11-cis-Retinal in all-trans-Retinal umgewandelt. Diese Konformationsänderung bewirkt eine Hyperpolarisation der Zelle, wodurch ein neuronales Signal ausgelöst wird. Anschließend kommt dem RPE eine weitere wichtige Aufgabe zu, nämlich die Regeneration von all-trans-Retinal zu 11-cis-Retinal, wozu das Photopigment erst in das RPE gebracht, in all-trans-Retinol

umgewandelt und anschließend als all-trans-Retinal zurück in die Sinneszellen transportiert wird.

Die Verteilung von Zapfen und Stäbchen in der Retina ist nicht homogen. In der Fovea centralis befinden sich ausschließlich Zapfen, die 1:1 mit Ganglienzellen verknüpft sind, wodurch eine besonders hohe Auflösung erreicht wird, was wiederum scharfes Sehen ermöglicht. Durch drei Sehpigmente unterschiedlicher Sensitivität können verschiedene Wellenlängen wahrgenommen und somit Farbeindrücke vermittelt werden. Die Peripherie hingegen weist hauptsächlich Stäbchen auf, die zwar lichtempfindlicher sind, aber keine Farben wahrnehmen können. Außerdem konvergieren hier mehrere Stäbchenzellen auf eine Ganglienzelle, was zu einer geringeren Auflösung führt (Welsch, 2003).

1.2 Morbus Stargardt

Erstbeschreiber und Namensgeber der Stargardt'schen Erkrankung ist Klaus Stargardt, der im Jahre 1909 einen Artikel „Über familiäre, progressive Degeneration in der Maculagegend des Auges“ im Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology verfasste. Es handelt sich um eine juvenile Makuladystrophie mit einer Inzidenz von 1:10000 (Blacharski, 1988), die sich durch Veränderungen des Augenhintergrundes, genauer der Makula, auszeichnet. Sie fällt durch Sehschärfenminderung meist schon in der ersten oder zweiten Lebensdekade auf, kann sich aber auch erst im vierten oder fünften Lebensjahrzehnt manifestieren. Der 1963 von Franceschetti beschriebene Fundus flavimaculatus, gekennzeichnet durch über den Augenhintergrund verteilte gelbe Flecken, wird heute als eine Erscheinungsform der Erkrankung betrachtet, mit späterem Auftreten von Symptomen und langsamerer Progression (Briggs, 2001). Morbus Stargardt wird fast ausschließlich autosomal rezessiv vererbt und tritt bilateral auf. Das Leitsymptom ist ein progressiver Visusverlust (Noble et al., 1979). Mutationen im Peripherin/RDS (*retinal degeneration, slow*)-Gen, die ein autosomal dominantes Vererbungsmuster zeigen, rufen ein Krankheitsbild hervor, das dem autosomal rezessiv vererbten Morbus Stargardt ähnelt, sich jedoch im Vererbungsmuster und der Prognose für die Sehfähigkeit unterscheidet (Boon et al., 2007). Auch Mutationen im ELOVL4 (*elongation of very long chain fatty acids protein 4*) gelten als verantwortlich für eine autosomal dominante Form von Morbus Stargardt (Vrabec et al., 2003). Für die

autosomal rezessiv vererbte Stargardt'sche Erkrankung ist ein anderes Gen verantwortlich, das ABCA4-Gen (Kaplan et al., 1993). Der Genort wurde in die Region 1p21-p22 kartiert (Nasonkin et al., 1998). Mutationen in dieser Region können aber auch für andere Erkrankungen verantwortlich sein, darunter Retinitis pigmentosa und Zapfen-Stäbchen-Dystrophien (Cremers et al., 1998).

Das ABCA4-Gen kodiert für einen energieabhängigen membrangebundenen Transporter, den retinaspezifischen ABC-Transporter (ABCR). Es setzt sich genomisch aus 50 Exonen zusammen (Gerber et al., 1995). Das kodierte Protein besteht aus vier Domänen, zwei mit ATP-Bindungsstellen und zwei mit mehreren integralen Transmembrandomänen. Durch *in-situ-Hybridisierung* konnte gezeigt werden, dass das ABCA4-Gen in der Retina exprimiert wird, genauer in den Photorezeptoren (Allikmets et al., 1997; Molday et al., 2000).

Mutationen im ABCA4-Gen und damit Veränderungen des Transportproteins führen zu einer Akkumulation von Lipofuszin im RPE und in der Folge zu einer Verlangsamung des Stoffwechsels der Photorezeptoren (Cideciyan et al., 2003), was zu einer funktionellen Beeinträchtigung dieser Rezeptoren führt. Die Lokalisation des ABCR-Transporters in den Sehzellen konnte auf den Bereich der Disci spezifiziert werden (Sun et al., 1997). Dort arbeitet er als N-Retinylden-Phosphatidylethanolamin-Flippase (Maugeri, 2000).

Klinisch fällt die Erkrankung durch beidseitigen Visusverlust auf, außerdem durch Farbsinnesstörungen und Zentralskotome. Im Frühstadium finden sich nur geringe Veränderungen des Augenhintergrundes, wohingegen im fortgeschrittenen Stadium Destruktionen im RPE bis hin zum Auftreten einer sogenannten Schießscheibenmakulopathie zu erkennen sind. Am hinteren Pol können unregelmäßige gelbliche Flecken imponieren, der sogenannte Fundus flavimaculatus. Diagnostisch kann das Elektroretinogramm (ERG) eingesetzt werden. Dabei werden von der Netzhaut durch Lichtreize evozierte Potentiale aufgezeichnet. Zur Diagnostik generalisierter Netzhauterkrankungen ist das ERG gut geeignet, lokalisierte retinale Veränderungen können hingegen mittels Multifokal-ERG (mfERG) erkannt werden (Kellner & Wachtlin, 2008). Da Patienten mit Morbus Stargardt nur lokale Veränderungen auf der Retina zeigen, ist das ERG normal oder nur wenig reduziert. Im Gegensatz dazu können im mfERG schon in frühen Krankheitsstadien lokalisierte Amplitudenreduktionen nachgewiesen werden (Kellner et al., 2004).

In der Literatur sind verschiedene Arten von Mutationen beschrieben, von denen angenommen wird, dass sie verantwortlich für Morbus Stargardt sind. Die große Mehrheit sind mit circa 75% *missense*-Mutationen, gefolgt von *nonsense*-Mutationen, *splice site*-Mutationen (circa 10%) sowie Insertionen und Deletionen. Manche mutierten Allele treten in bestimmten Populationen häufiger auf, zudem sind die meisten Betroffenen nicht homozygot, sondern *compound* heterozygot, das heißt sie tragen zwei unterschiedliche Krankheitsallele in ihren beiden Kopien des ABCA4-Gens (Rivera et al., 2000).

Verschiedene Mutationen im ABCA4-Gen können unterschiedliche Phänotypen hervorrufen. Demnach besteht eine erkennbare Beziehung zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp. Eine Modellvorstellung geht davon aus, dass eine inverse Korrelation zwischen der Restaktivität des ABCA4-Transporters und der Ausprägung der Retinadystrophie besteht. Demnach ist Retinitis pigmentosa als schwerste Form mit zwei schwerwiegenden Mutationen auf beiden Allelen assoziiert, die keine oder nur wenig Aktivität des Transporters zulassen. Morbus Stargardt und autosomal rezessive Zapfen-Stäbchen-Dystrophie hingegen weisen auf einem Allel eine schwerwiegende und auf dem zweiten Allel eine mildere (Morbus Stargardt) oder moderate (Zapfen-Stäbchen-Dystrophie) Mutation auf, so dass eine Restaktivität des ABCA4-Transporters aufrecht erhalten werden kann (Maugeri et al., 2000).

1.3 Morbus Best und autosomal dominante

Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC)

Morbus Best wurde nach seinem Erstbeschreiber Friedrich Best benannt, der eine autosomal dominant vererbte, die Makula betreffende Augenerkrankung beobachtet hatte und darüber im Jahre 1905 in Dresden erstmals berichtete. Erste Symptome der Erkrankung können schon im ersten oder zweiten, jedoch auch erst spät im sechsten Lebensjahrzehnt auftreten und äußern sich als langsam progredienter Visusverlust. Ein typischer klinischer Befund für Morbus Best sind gelbe, scharf begrenzte Läsionen im Bereich der Makula, die einem Eidotter ähneln - daher auch der Begriff der vitelliformen Makuladystrophie - und lipofuszinhaltig sind. Zusätzlich diagnostisch wegweisend ist eine typische Reduktion des Hellanstieges im Elektrokulogramm (EOG) (Kellner et al., 2004, Stöhr et al., 2005). Das ERG ist

unauffällig, im mfERG kann im Bereich der sichtbaren Läsionen eine Amplitudenreduktion beobachtet werden. Außerdem kann es zu choroidaler Neovaskularisation kommen (Kellner et al., 2004). Der für Morbus Best verantwortliche Genort konnte in die Region q13 des Chromosoms 11 kartiert werden (Stone et al., 1992).

1982 veröffentlichte Stuart Kaufman erstmals einen Artikel über autosomal dominante Vitreoretinchoroidopathie (ADVIRC). Dabei handelt es sich um eine Dystrophie des Augenhintergrundes, die nicht speziell die Makula betrifft, sondern auf die Peripherie beschränkt ist. Bei der Untersuchung des Augenhintergrundes fallen sowohl Hyper- als auch Hypopigmentierungen der Retina und Choroidea auf, zum Beispiel ein kreisförmiges hyperpigmentiertes Band in der Peripherie der Retina, sowie punktförmige, weiße Trübungen. Außerdem kann bei manchen Betroffenen eine präsenile Katarakt auftreten. Der Glaskörper zeigt eine Mitbeteiligung durch fibrilläre Kondensation und eine mäßige Anzahl an Zellen. Auch die Aderhaut ist mitbetroffen, im Sinne von vaskulären Stenosen und Insuffizienzen, Beeinträchtigung der Blut-Netzhaut-Barriere und Aderhautatrophie (Kaufman et al., 1982). ADVIRC macht sich bemerkbar durch Augenentwicklungsstörungen, z.B. Nanophthalmos, und langsam fortschreitenden Sehverlust, der auf Makulaödeme zurückzuführen ist, die durch die gestörte Blut-Netzhaut-Barriere entstehen. Der Sehverlust scheint aber auch durch retinale Neovaskularisation bedingt zu sein (Blair et al., 1984). Weitere Augenentwicklungsstörungen äußern sich in Sehnerv-Dysplasie und Irisfehlentwicklungen (Vincent et al., 2011). ERG und EOG zeigen, abhängig vom Ausmaß der Läsionen, Amplitudenreduktionen (Kellner et al., 2004).

Ursächlich für Morbus Best und ADVIRC sind Veränderungen im VMD2-Gen auf Chromosom 11, auch BEST-1-Gen genannt (Marquardt et al., 1998, Yardley et al., 2004). Das Gen, das elf Exone umfasst, wird im RPE exprimiert und kodiert das Transmembranprotein Bestrophin (Marquardt et al., 1998). Dieses Protein besteht aus 585 Aminosäuren und könnte einen Chlorid-Kanal kodieren, scheint aber auch andere Ionen, zum Beispiel Bikarbonat, zu leiten (Sun et al., 2002). Außerdem ist Bestrophin an der Regulation von Calcium-Kanälen beteiligt, indem es die Aktivität von L-Typ-Calcium-Kanälen kontrolliert. Als Modell wird vorgeschlagen, dass das VMD2-Genprodukt die synergistische Funktion beider Kanäle gewährleistet (Rosenthal et al., 2005). Man nimmt an, dass Bestrophin aus vier bis sechs Transmembrandomänen besteht. Es existieren zwei Modelle, die sich in der

Integration der Transmembrandomänen vier und fünf unterscheiden (Milenkovic et al., 2007). Nach dem Modell von Milenkovic et al. (2007) sind die Domänen eins, zwei, fünf und sechs tatsächlich in die Membran integriert, während die dritte und vierte Domäne Teil einer hydrophoben Schleife im Zytoplasma sind. Tsunenari et al. (2003) gehen davon aus, dass die Transmembrandomäne vier ebenfalls in die Membran integriert ist und Domäne fünf sich nur in der Schicht der Lipiddoppelschicht der Zellmembran befindet, die dem Extrazellulärraum zugewandt ist.

Da Bestrophin ein Bestandteil des RPE ist, können Mutationen im VMD2-Gen dessen Funktion beeinträchtigen und so zu Erkrankungen wie Morbus Best oder ADVIRC führen.

Unter den bisher bekannten Mutationen des BEST-1-Gens, die verantwortlich für Morbus Best gemacht werden, haben *missense*-Mutationen mit 93% den größten Anteil. Nur eine *splice site*-Mutation konnte bis heute identifiziert werden, andere Mutationen führen zu Basenpaar-Deletionen. Für VMD2-Mutationen, die ADVIRC hervorrufen, wird diskutiert, dass Punktmutationen nicht nur einen Aminosäureaustausch bewirken, sondern auch den Spleißprozess beeinträchtigen (Yardley et al., 2004).

1.4 Analyse des Spleißverhaltens mittels *in vitro* Exon-trapping

Analysen

Ein Gen setzt sich genomisch aus kodierenden und nicht-kodierenden Abschnitten zusammen, den sogenannten Exonen und Intronen. Außerdem besitzt jedes Gen einen regulatorischen Bereich mit Enhancern, Silencern sowie cis- und trans-regulatorischen Promotersequenzen. Durch den Vorgang des Spleißens werden Introne entfernt und Exone zusammengefügt. So wird auf dem Weg zum Protein aus prä-mRNA eine *messenger*-RNA (mRNA) gebildet. Schließlich entsteht aus dieser mRNA durch Translation das Protein (Mülhardt, 2003).

Exone sind gekennzeichnet durch kurze *splice site*-Sequenzen (3' *splice site*, 5' *splice site* und *branch site*) an der Grenze zwischen einem Exon und den flankierenden Intronen (siehe Abbildung 1). Die 3' *splice site* wird auch *acceptor splice site* genannt, entsprechend jene am 5'-Ende des Introns *donor splice site*. An

diese Sequenzen binden Komponenten des Spleißapparates, die den Zusammenbau des Spleißosoms, eines Komplexes aus fünf *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNP) und mehr als 100 Proteinen, initiieren. So bindet zum Beispiel das U1 snRNP über RNA-RNA-Interaktionen an die *branch site*. Das Spleißosom gewährleistet korrektes Spleißen, indem es Exon-Intron-Grenzen erkennt, Introne entfernt und Exone zusammenfügt. Neben den klassischen *splice sites* spielen aber auch noch andere Sequenzen eine Rolle beim erfolgreichen Erkennen von Exon-Intron-Grenzen, sogenannte cis-Elemente, bekannt als *exonic* und *intronic splice enhancers* (ESEs und ISEs) und *exonic* und *intronic splice silencers* (ESSs und ISSs) (Faustino & Cooper, 2003). An diese cis-Elemente können SR-Proteine (Serin/Arginin-reiche Proteine) binden. Sie haben viele Funktionen im Zusammenhang mit dem Spleißvorgang, wie zum Beispiel bei der Bindung von U1 snRNP und U2 *auxiliary factor* (U2AF) an die Spleißstellen. Alle SR-Proteine haben eine N-terminale Domäne, die es ihnen ermöglicht, an RNA zu binden, und eine C-terminale RS-Domäne für Protein-Interaktionen bei der Rekrutierung von Faktoren, die für den regelrechten Zusammenbau des Spleißosoms wichtig sind (Graveley, 2000). Es besteht also ein komplexes Netzwerk, das eine fehlerfreie Prozessierung von prä-mRNA zu mRNA ermöglicht. Mutationen können diesen Ablauf stören, indem sie Sequenzen der *splice sites* oder cis-Elemente verändern und eine korrekte Prozessierung verhindern. Auf diese Weise können Mutationen Krankheiten verursachen.

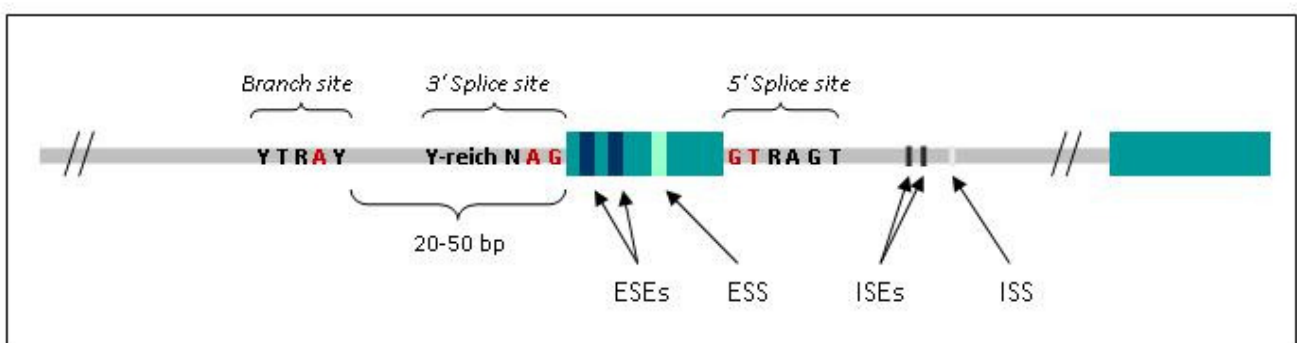


Abb. 1: Splice sites und cis-Elemente

Grau dargestellt sind Anteile des Introns, grün dargestellt Exone. N: A, C, G oder T; R: Purine (A oder G); Y: Pyrimidine (C oder T). Die rot markierten Basen am Intron-Exon- (A und G), Exon-Intron-Übergang (G und T) und in der branch site (A) müssen für einen korrekten Spleißablauf zwingend vorhanden sein. Schwarz markierte Basen treten mit einer Wahrscheinlichkeit von 50-90% wie abgebildet auf.

cis-Elemente (ESE, ESS, ISE und ISS) finden sich sowohl exonisch als auch intronisch.

Quelle: eigene Abbildung nach Faustino & Cooper (2003) und Schneider et al. (2007)

Um herauszufinden, welche Auswirkung Mutationen auf den Spleißvorgang haben, kann mRNA aus Zellen isoliert und analysiert werden. Ist dies nicht möglich, zum Beispiel weil die entsprechende mRNA in peripheren Blutzellen nicht oder in zu geringen Mengen exprimiert wird, kann eine *in vitro*-Analyse mit Hilfe eines *Exon-trapping*-Assays durchgeführt werden (Schneider et al., 2007).

Ein für diese Zwecke häufig eingesetzter Vektor ist der pSPL3-Vektor. Er enthält für Kaninchen- β -Globin kodierende Sequenzen aus einem Teil des HIV-*tat*-Gens (Burn et al., 1995). Der Vektor entspricht einem Plasmid, das ein Minigen, bestehend aus zwei Exonen und einer dazwischen liegenden *multiple cloning site*, enthält (siehe Abbildung 2). In diese *multiple cloning site* kann ein ausgewählter genomischer DNA-Abschnitt kloniert werden. Werden anschließend Säugetierzellen mit der Vektor-DNA transfiziert, findet in den Zellen ein Spleißvorgang statt. Die Analyse der mRNA dieser Zellen zeigt dann, wie die DNA *in vitro* gespleißt wurde (siehe Abbildung 3).

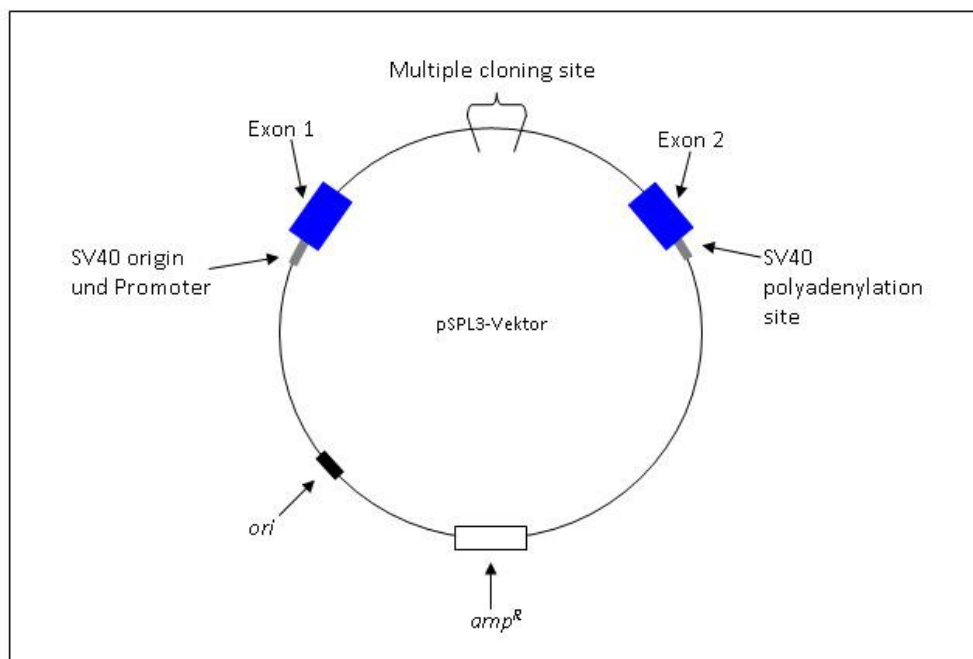


Abb. 2: pSPL3-Exon-trapping-Vektor

Das Plasmid enthält ein Minigen, bestehend aus Exon 1 und 2 und einer multiple cloning site. Der SV40-Promoter ermöglicht die Transkription in transfizierten Cos7-Zellen.

ori (Replikationsursprung) und amp^R (Ampicillinresistenz) werden benötigt zur Replikation in *E.coli* und Selektion.

Quelle: eigene Abbildung nach Garland Science (1999) (Webadresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=hmg&part=A1236&rendertype=figure&id=A1308>)

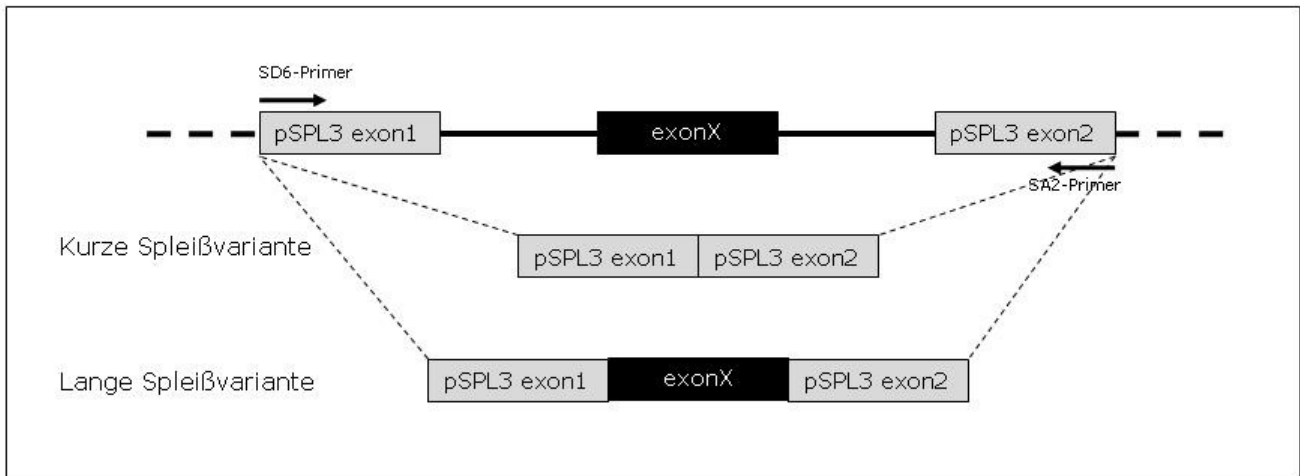


Abb. 3: Mögliche Spleißvarianten

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem pSPL3-Vektor (grau) mit bereits kloniertem Exon (schwarz). Nach dem Spleißvorgang, cDNA-Synthese und RT-PCR (siehe 3.5.3 und 3.5.4) können die Spleißvarianten mittels Vektor-spezifischen Primern (SD6 und SA2) amplifiziert werden. Kann Exon X korrekt gespleißt werden, entsteht die lange Spleißvariante, wird es übersprungen (Exon-skipping), die kurze.

Quelle: eigene Abbildung

Das *Exon-trapping* ist ein häufig genutztes Verfahren, um vorherzusagen, ob Mutationen in einem Bereich genomischer DNA einen Effekt auf das Spleißen *in vivo* haben könnten. Da es sich aber trotz allem um ein *in vitro*-Modell handelt, kann es nicht in allen Fällen die Verhältnisse im Lebenden genau widerspiegeln (Schneider et al., 2007).

1.6 Aufgabenstellung

Zielsetzung der Arbeit war es, das Spleißverhalten von ausgewählten DNA-Abschnitten von Patienten mit Morbus Stargardt, Morbus Best oder ADVIRC mit Hilfe des *in vitro*-Spliceassays zu analysieren. Dazu wurde die Arbeit in zwei Projektbereiche unterteilt, die sich mit der Analyse von Mutationen im ABCA4- und VMD2-Gen beschäftigten.

Im ABCA4-Gen wurden durch Sequenzierung Mutationen in den Genen von Patienten mit Morbus Stargardt identifiziert. Einige dieser Mutationen waren im Hinblick auf die Frage interessant, ob sie das Spleißverhalten des gewählten DNA-Abschnittes beeinflussen könnten und so ein defektes Genprodukt erzeugen. Neben der *Exon-trapping*-Analyse wurden zwei Programme herangezogen, um die

theoretischen Effekte der Mutationen auf den Spleißvorgang zu ermitteln (BDGP *splice site prediction* und *Splice score calculation*, siehe 2.9).

Im Projekt um das VMD2-Gen stellte sich die Frage, wie benachbarte Mutationen im gleichen Gen verschiedene Krankheiten auslösen können. 2004 wurde von Yardley et al. die Hypothese aufgestellt, dass Mutationen im VMD2-Gen, die ADVIRC verursachen, das Spleißen beeinträchtigen, während Best-Mutationen nicht das Spleißverhalten beeinflussen, sondern zum überwiegenden Teil zu einem Austausch einer Aminosäure führen (*missense*-Mutationen) Diese Annahme wurde auch durch Burgess et al. (2008) gestützt, die konstatieren, dass ADVIRC-Mutationen ESE-Sequenzen verändern und so das Spleißen beeinträchtigen. Mit Hilfe der *Exon-trapping*-Analyse und einer Software zur Vorhersage von ESE (ESEfinder 2.0, siehe 2.9) sollte diese Hypothese überprüft werden.

2. Material

2.1 Organismen und Zellen

Stamm/Zelltyp	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
E.coli DH5α	Siehe Appendix in Sambrook et al., 1989	Invitrogen/Sambrook et al. 1989
Cos 7	eukaryotische Zelllinie	Gewonnen aus Nierengewebe der Grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)

Tabelle 1: Organismen und Zellen

2.2 Primer

Primer	Sequenz (5'-3')
ABCA4	
EcoRI-ABCA4-ex3-F	CCGGAATTCCCTGCTTGGTCTCCATGAC
BamHI-ABCA4-ex3-R	CGCGATCCACGTGAAGGGGTGTGCAAC
EcoRI-ABCA4-ex8-F	CCGGAATTCAGATTATGACTCTAGCTGCC
EcoRV-ABCA4-ex8-R	CGCGATATCCCCAGGTTTGGTTTCACCTA
EcoRI-ABCA4-ex9-F	CCGGAATTCAGTTACAAGCAATGGGGAG
EcoRV-ABCA4-ex9-R	CGCGATATCTCTGGGAGGTCCAGGGTAC
EcoRI-ABCA4-ex10-F	CCGGAATTCCCAAAGTTCTCTCTCACTTTTCT
EcoRV-ABCA4-ex10-R	CGCGATATCCTGGGAAAAGGAAACAAGTGGAA
EcoRI-ABCA4-ex25-F	CCGGAATTCGGTAACCTCACAGTCTTCC

BamHI-ABCA4-ex25-R	CGCGGATCCGGGAACGATGGCTTTTTGC
ABCR39FEcoRI-linkF	CCGGAATTCGCCCCACCTGCTGAAGAG
ABCR40BamHI-linkR	CGCGGATCCTCTGGATGCCCTGAGCTGC
ABCR43EcoRI-linkF	CCGGAATTCCTTACCCTGGGGCCTGAC
ABCR44BamHI-linkR	CGCGGATCCTGCACTCTCATGAAACAGGC
VMD2	
EcoRI-VMD2-ex4_F2	CCGGAATTCCGCTCGCAGCAGAAAGCT
BamHI-VMD2-ex4R3	CGCGGATCCATTCCTGCCGCGCCCATC
pGEM-T-Easy	
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
M13-R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
pSPL3B	
SA2 (R)	ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC
SA4 (R)	CACCTGAGGAGTGAATTGGTCG
SD2 (F)	GTGAACTGCACTGTGACAAGC
SD6 (F)	TCTGAGTCACCTGGACAACC
pSPL3-R	GGTTGCTTCCTTCCACACAG

Tabelle 2: Primer

Alle im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion synthetisiert, mit Ausnahme der oligo(dT)₁₅ Primer der Firma Promega.

2.4 Plasmide

Plasmid	Größe (kb)	Resistenz	Verwendung	Hersteller
pGEM-T Easy	3,0	Ampicillin	Selektion von Wildtyp- DNA und Mutanten-DNA	Promega
pSPL3B	6,0	Ampicillin	Transfektion	Gibco Life Technology

Tabelle 3: Plasmide

2.4 Enzyme

Enzyme	Anwendung	Hersteller
Restriktionsenzyme (<i>EcoRI</i> , <i>EcoRV</i> , <i>BamHI</i>)	Plasmidverdau	NEB
Taq Polymerase	PCR	Labor
GXX Taq Polymerase	PCR	Genaxxon Bioscience GmbH
Fermentas Taq-Polymerase	PCR	Fermentas
T4 DNA Ligase	Ligation	NEB; M0202
Exonuclease I	Verdau von Primern und einsträngiger DNA im PCR-Produkt	USB
Antarctic Alkaline Phosphatase (AAP)	Verdau von verbliebenen dNTPs im PCR-Produkt	NEB

Tabelle 4: Enzyme

2.5 Chemikalien

Chemikalie	Verwendung	Hersteller
dNTP Mix	Reverse Transkription	Fermentas
β -Mercaptoethanol	RNA-Isolierung	Sigma
1 kb-Leiter	Standard für Agarosegele	Invitrogen
RNAse freies Wasser	cDNA-Synthese	Qiagen
IPTG	Blau-Weiß-Selektion	AppliChem
X-Gal	Blau-Weiß-Selektion	Sigma
Ethanol	Verschieden	Sigma
Trypsin/EDTA 10x	Trypsinierung	PAA
Ethidiumbromid	Agarosegel	AppliChem

Tabelle 5: Chemikalien

2.6 Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
First-strand cDNA Synthesis Kit	cDNA-Synthese	Fermentas
FuGENE 6 Transfection Kit	Transfektion (ABCA4)	Roche
<i>TransIT</i> -LT1 Transfection Reagent	Transfektion (VMD2)	Mirus
NucleoSpin Extract II	Gelaufreinigung	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid Mini Kit	Plasmid-DNA Isolierung	Macherey-Nagel

NucleoBond AX	Plasmid-DNA Isolierung	Macherey-Nagel
QIAshredder	Zelllyse bei RNA-Isolierung	Qiagen
RNeasy Mini Kit	RNA-Isolierung	Qiagen
pGEM-T-Easy Vector System I	Klonierung	Promega
BigDye v1 Terminator Sequencing Kit	Sequenzierung	Applied Biosystems

Tabelle 6: Kits

2.7 Medien, Puffer und Lösungen

Medium	Zusätze	Anwendung	Hersteller
DMEM High Glucose (4,5g/l)	10%FCS, 1% Penicillin/Streptomycin	Medium für Cos7	PAA
LB Platten und Flüssigmedium	w/o Ampicillin	Selektion von DH5α	Labor
SOC Flüssigmedium	w/o Ampicillin	Nährmedium für DH5α	Sigma

Tabelle 7: Medien

Puffer/Lösung	Anwendung	Zusammensetzung
10x PBS	Zellkultur	1,5 M NaCl, 83 mM Na ₂ HPO ₄ , 17 mM H ₂ PO ₄ x H ₂ O (pH7,4)
10x TBE	Gelelektrophorese	1M Tris; 1M Borsäure; 20mM EDTA (pH7,5)
Agarosegel	Gelelektrophorese	1-2% (w/v) Agarose in 1x TBE-Puffer
10x DNA Auftragspuffer	Agarosegel	Tris/HCl (pH7,5; 10mM); Sodium Acetat (5mM); EDTA (2mM); Glycerol (10%); Bromphenolblau; 0,001% (w/v) Xylencanol

Tabelle 8: Puffer und Lösungen

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Medien und Puffer wurden mit Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage der Firma Millipore verdünnt.

2.8 Verbrauchsmaterialien

Material	Verwendung	Hersteller
Biozym LE Agarose	Agarosegel	Biozym
0,5/1,5/2,0 ml Cups	Verschieden	Sarstedt
PCR-Cups	PCR	Brand Life Science Products
15/50 ml Falcon Tube	Verschieden	Sarstedt
10/100/1000 µl Pipetten	Verschieden	Eppendorf
10/100/1000 µl Pipettenspitzen	Verschieden	Omnitip
Einmalhandschuhe	Verschieden	Kimberly-Clark
Nitrilhandschuhe	Verschieden	VWR International
Zellschaber 25 cm	RNA-Isolierung	Sarstedt
6 Well Cell Culture	Zellkultur	Corning
100mmx20mm Dish	Zellkultur	Corning

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

2.9 Geräte und Software

Geräte	Verwendung	Hersteller
Brutschrank CB 210	Zellkultur	Binder
Gelkammer Blue Marine 200	Gelelektrophorese	Servo Electrophoresis
Biostep Dark Hood	Geldokumentation	Biostep
Mikrozentrifuge	Verschieden	Labnet
Netzgerät Blue Power Plus	Gelelektrophorese	Blue Power
NanoDrop	Konzentrationsbestimmung DNA/RNA	PeqLab
Sterilbank	Zellkultur	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Thermocycler	PCR	Biometra
Thermomixer 5436	Verschieden	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge pico	Verschieden	Heraeus
Vortex Genie 2 G-560E	Verschieden	Scientific Industries
Zentrifuge Megafuge 1,0R	Verschieden	Heraeus
3130xl Genetic Analyzer	Sequenzierung	Applied Biosystems
Certomat R	Tischschüttler	B.Braun
Certomat HK	Inkubatorhaube	B.Braun

Tabelle 10: Geräte

Software	Verwendung	Hersteller/Webadresse
Argus 3.0	Geldokumentation	Argus
SeqScape	Sequenzanalyse	Applied Biosystems
Sequence Scanner 1.0	Sequenzanalyse	Applied Biosystems
ESEfinder 2.0	Analyse von exonic splice enhancers	http://rulai.cshl.edu/tools/ESE2/
BDGP splice site prediction	Analyse von Spleißstellen	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
Splice score calculation	Analyse von Spleißstellen	Siehe 3.5.2
ApE – A Plasmid Editor v.1.10.1	Verschieden	http://www.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/
Phoretix TotalLab TL120	Auswertung von Agarosegelen	Biostep

Tabelle 11: Software

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Escherichia coli (E.coli)

Zur Transformation von Plasmid-DNA (siehe 2.3) wird der E.coli DH5 alpha-Bakterienstamm verwendet. Zur Vervielfältigung der Bakterien werden diese bei 37° Celsius in LB-Flüssigmedium (*liquid broth*-Medium) oder auf LB-Platten, jeweils mit Ampicillin, inkubiert. Die Inkubation des Flüssigmediums erfolgt bei 300 rpm (rotations per minute), je nach Bedarf in Falcons zu 15 ml oder 50 ml oder bei größeren Volumina in Erlenmeyerkolben. Ampicillin dient dabei der Selektion.

Klone, die die gewünschten Plasmidkonstrukte enthalten, werden als Glycerinkultur aufbewahrt. Dazu werden 100 µl des zuvor über Nacht inkubierten Flüssigmediums mit 900 µl sterilem, 85%igen Glycerol vermischt und bei -80° Celsius eingefroren.

Eine Möglichkeit, die Bakterienkolonien einer LB-Platte mit Ampicillin zu identifizieren, die erfolgreich transformiert wurden, ist die sogenannte Blau-Weiß-Selektion (α -Komplementation). Dazu wird auf LB_{amp}-Platten (LB-Platten mit Ampicillin) jeweils 10 µl IPTG (0,1M) (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) und 50 µl X-Gal [40mg/ml] (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) (siehe 2.5) ausplattiert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels von X-Gal wird die Bakteriensuspension ausplattiert und anschließend bebrütet. Die Blau-Weiß-Selektion beruht auf folgendem Mechanismus: ein intaktes lacZ-Gen eines Plasmids kann eine β -Galactosidase exprimieren, die durch ihre enzymatische Aktivität das Galaktosid X-Gal spaltet, wodurch ein blauer Farbstoff entsteht. Wird das lacZ-Gen des Plasmids durch Insertion eines DNA-Fragments unterbrochen, bleibt die Expression der β -Galaktosidase aus. Rekombinante Klone können folglich an ihrer weißen Farbe erkannt werden (Mülhardt, 2003).

3.1.2 Cos7-Zelllinie

Die Zellkultur von Cos7-Zellen erfolgt unter sterilen Bedingungen (Sterilbank BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH). Die Zellen werden in 100mm x 20mm Dishes (siehe 2.8) in 1x Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) + 10% fötales Kälberserum (fetal calf serum, FCS) + 1% Penicillin/Streptomycin (siehe 2.7) kultiviert, unter optimalen Bedingungen im Brutschrank (siehe 2.9) bei 37° Celsius und 5% CO₂ in einer durch Wasserdampf abgesättigten Atmosphäre. Wachstum und Zustand der Zellen kann täglich mit Hilfe eines Mikroskops (Leica DM IL) kontrolliert werden.

Ist die Zellkultur-Platte nach zwei bis drei Tagen zu etwa 100% bewachsen, müssen die Zellen zur Stammhaltung gesplittet werden. Dazu wird das alte Medium abgezogen und die Platte mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen. Anschließend werden die Zellen durch Zugabe von 2 ml PBS mit Trypsin/EDTA und circa dreiminütiger Inkubation im Brutschrank von der Plattenoberfläche gelöst. Die Trypsinierung der Zellen wird mittels Zugabe von 10 ml DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin gestoppt. Schließlich werden je 2 ml dieser Lösung mit je 8 ml frischem Medium in eine neue Platte gegeben und im Brutschrank kultiviert.

3.2 DNA

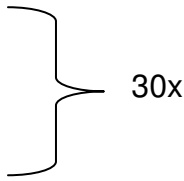
3.2.1 Polymerase Ketten Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die Polymerase Ketten Reaktion ist ein gängiges Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes *in vitro*. Zur sogenannten Amplifikation benötigt man eine DNA-Matrize, ein sequenzspezifisches, komplementäres Oligonukleotidpaar (*forward*- und *reverse*-Primer), thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*), einen Nukleotid-Mix (dNTPs: Guanin, Adenin, Cytosin, Thymin) und Puffer. Die Primer werden so ausgewählt, dass die gewünschte Sequenz zwischen ihnen liegt.

Im Thermocycler wird die DNA-Matrize zunächst bei 95° Celsius denaturiert, das heißt in zwei Einzelstränge aufgetrennt. In einem nächsten Schritt lagern sich bei einer Annealing-Temperatur von 50-65° Celsius die Primer an. Die optimale Annealing-Temperatur kann experimentell mittels eines Gradientencyclers, der die

Annealing-Temperatur variiert, ermittelt werden. Die Elongation der Primer entlang der DNA-Matrize zu einem neuen Tochterstrang wird bei einer Temperatur von 72° Celsius gewährleistet, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase. Je nach Länge der PCR-Produkte dauert die Elongation 30 Sekunden (DNA-Fragmente bis 1kb) bis 1 Minute oder länger. Diese Schritte werden circa dreißig Mal wiederholt. Abschließend wird 5 Minuten bei 72° Celsius elongiert, um eine möglichst vollständige Auffüllung der DNA-Stränge zu garantieren.

Folgendes Schema gibt die Bedingungen einer Standard-PCR wieder:

1. Initiale Denaturierung: 5 min, 95 °C
 2. Denaturierung: 30 sec, 95 °C
 3. Annealing: 30 sec, 50-65 °C
 4. Elongation: 30 sec – 2 min, 72 °C
 5. Finale Elongation: 5 min, 72 °C
- 
- A right-facing curly bracket groups steps 2, 3, and 4. To the right of the bracket is the label '30x'.

Folgender Reaktionsansatz wird für eine Standard-PCR verwendet:

5 µl 10xPuffer (0,2M Tris-HCl pH8,4, 0,5M KCl)

0,5-1 µl MgCl₂ (50mM)

4 µl dNTP (10mM)

2 µl Forward-Primer (10pmol/ µl)

2 µl Reverse-Primer (10pmol/ µl)

0,4 µl Taq-Polymerase

4 µl Template-DNA (ca. 25ng/ µl)

Ad 50 µl Millipore H₂O

50 µl Gesamtvolumen

Die Mg²⁺-Ionenkonzentration beeinflusst die Ausbeute der PCR durch die Mg²⁺-Wirkung unter anderem auf Primerannealing, Trennung der Stränge bei der Denaturierung und Aktivität des Enzyms. Zur Optimierung einer PCR kann die Mg²⁺-Konzentration variiert werden. Sie liegt zumeist zwischen 0,5 und 2,5 mM.

Mit Zusätzen wie Dimethylsulfoxid (DMSO) (bis 10% v/v) und Formamid (bis 5% v/v) können Spezifität erhöht und die Amplifikation von GC-reichen Sequenzen erleichtert werden (Mülhardt, 2003).

3.2.2 Aufreinigung von DNA nach PCR

Soll das PCR-Produkt aufgereinigt werden, geschieht dies mit NucleoSpin Extract II (siehe 2.6). Das Produkt wird in 25 µl Millipore A.D. eluiert.

3.2.3 Auftrennung und Analyse von DNA

Die Methode der Wahl, um DNA-Fragmente von 0,5 bis 25 kb Länge voneinander trennen und analysieren zu können, ist die Agarose-Gelelektrophorese. Dazu löst man, je nach Größe der zu analysierenden Probe, 1% (w/v) bis 2% (w/v) Agarose (siehe 2.8) in einer entsprechenden Menge TBE-Puffer (siehe 2.7). Nach Zugabe von Ethidiumbromid (siehe 2.5) wird die Lösung aufgeköcht und in Gelschlitten mit Kämmen gegossen. Nach Erstarren des Gels kann die DNA-Lösung mit Hilfe eines Auftragspuffers (siehe 2.7) in die Geltaschen pipettiert werden. Die Elektrophorese wird in Gelkammern (siehe 2.9) durchgeführt, als Laufpuffer dient 1x TBE. Bei physiologischen pH-Werten tragen die Phosphatreste der Nukleinsäuren mindestens eine negative Ladung pro Base (Dominik & Steinhilber, 2002). Durch Anlegen von Spannung zwischen 50 und 150 Volt mit Hilfe eines Netzgerätes (siehe 2.9) wandert die DNA, je nach Größe schnell oder langsam, von der Kathode zur Anode und wird somit nach Größe aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde zuvor ein 1-kb Größenstandard (siehe 2.5) mit auf das Gel aufgetragen.

Die Analyse der fluoreszierenden DNA-Banden erfolgt mit Hilfe einer Dark Hood und der zugehörigen Software (Argus 3.0, siehe 2.9) (Mühlhardt, 2003).

3.2.4 Gelextraktion von DNA

Weist ein PCR-Produkt nach Gel-Elektrophorese mehrere Banden auf und soll nur eine dieser Banden weiterprozessiert beziehungsweise analysiert werden, kann das DNA-Fragment mit Hilfe von NucleoSpin Extract II nach Handbuch aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt werden.

3.2.5 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Um Konzentration und Reinheitsgrad von in Wasser gelöster DNA zu bestimmen, wird mit einem Spektrophotometer (NanoDrop, siehe 2.9) die Absorption der Proben bei 260 und 280 nm bestimmt. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes kann aus der Absorption die Konzentration einer Lösung bestimmt werden: $A = \varepsilon \cdot c \cdot d$, wobei A = Absorption, ε = Absorptionskoeffizient [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$], c = Konzentration der Lösung [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$], d = Schichtdicke [cm] (Dominik & Steinhilber, 2002). Der durch die Absorption bedingte Verlust an Licht wird auch als Extinktion bezeichnet. 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA zeigen eine Extinktion von eins. Als Referenz dient Nuklease-freies Wasser.

3.2.6 Klonieren von PCR-Produkten

Um ein PCR-Produkt in Vektoren klonieren zu können und zusätzlich eine bestimmte Orientierung zu gewährleisten (*site directed cloning*), wurden für die Amplifikation Primer gewählt, die Enzym-Schnittstellen enthalten. Der *forward*-Primer beinhaltet eine *EcoRI*-Schnittstelle, der *reverse*-Primer ein *BamHI*- oder *EcoRV*-Schnittstelle, so dass das PCR-Produkt mittels Restriktionsverdau (siehe 3.2.8) wieder aus dem Vektor entfernt werden kann.

Jedes zu analysierende PCR-Produkt wird erst in den p-GEM-T-Easy-Vektor kloniert, um eine Selektion von Wildtyp und Mutante zu ermöglichen. Anschließend werden die selektierten Produkte aus dem Vektor entfernt und in den pSPL3B-Vektor eingebracht.

Um das PCR-Produkt in den pGEM-T-Easy-Vektor zu klonieren, wird es zuvor mit einer Taq-Polymerase amplifiziert, die an das 3'-Ende ein Adenin hinzufügt. So kann es direkt in den Vektor eingefügt werden, da dieser an beiden 3'-Enden ein Thymidin besitzt, das komplementär zum A-Überhang des PCR-Produktes ist (Kobs, 1997). Die Ligation erfolgt laut Anleitung.

Um eine Klonierung mit dem Vektor pSPL3B durchzuführen, muss dieser zuerst mittels der Enzyme *EcoRI* und *BamHI/EcoRV* verdaut werden (siehe 3.2.8).

Eine Ligation wird in einem molaren Verhältnis von Insert:Vektor von 1:9 zusammen mit 2 μl 10x Ligase Puffer (Invitrogen) und 1 μl T4 DNA Ligase (1U/ μl) (siehe 2.4) in

einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Die Reaktion läuft bei 14° Celsius über Nacht (ÜN) ab.

Um Plasmide nach erfolgter Ligation vervielfältigen zu können, werden diese in transformationskompetente Bakterien mittels Hitzeschock transformiert. Dazu werden 3 µl Ligationsansatz und 50 µl kompetente E.coli DH5 alpha-Zellen gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach exakt 45 Sekunden Hitzeschock bei 42° Celsius und anschließender fünfminütiger Inkubation auf Eis wird 800 µl warmes LB-Medium zugegeben und der Ansatz bei 37° Celsius im Schüttler 45 Minuten bebrütet. Schließlich wird die Bakterienlösung auf vorgewärmten LB_{amp}-Platten (siehe 2.7) ausplattiert und über Nacht bei 37° Celsius inkubiert.

Ist eine Blau-Weiß-Selektion der wachsenden Bakterien erwünscht, so werden die LB_{amp}-Platten vor dem Ausplattieren entsprechend präpariert (siehe 3.1.1).

3.2.7 Plasmid-DNA-Präparationen

Um Plasmid-DNA aus E. coli DH5 alpha zu isolieren und aufzureinigen, wird eine Plasmid-DNA-Präparation mit NucleoSpin Plasmid Mini Kit oder NucleoBond AX Midi Kit (siehe 2.6) durchgeführt. Zur Plasmid-DNA-Präparation aus 5 ml LB_{amp}-ÜN-Flüssigkultur wird das Mini Kit benutzt, zur Präparation aus 100 ml LB_{amp}-ÜN-Flüssigkultur das Midi Kit. Die Plasmid-DNA wird in 30 µl (Mini Kit) beziehungsweise in 100 µl (Midi Kit) sterilem Wasser eluiert und kann bei -20° Celsius aufbewahrt werden.

3.2.8 Restriktionsverdau

Zum enzymatischen Ausschneiden eines Insert aus einem Vektor benötigt man Restriktionsendonukleasen. Diese Enzyme werden aus Bakterien gewonnen und haben die Eigenschaft, an bestimmten Sequenzen zu hydrolysieren. Diese Erkennungssequenzen sind palindromisch angeordnet, das heißt sie haben auf beiden DNA-Strängen die gleiche Basenabfolge in die gleiche Richtung (Mülhardt, 2003).

Um ein Plasmid zu verdauen, wird ein Doppelverdau mit zwei entsprechenden Restriktionsenzymen, 100-150 ng/µl Plasmid und bovinem Serumalbumin in einem

Gesamtvolumen von 100 µl gemäß Herstellerangaben angesetzt und über Nacht bei 37° Celsius inkubiert.

3.2.9 Sequenzierung

Die Analyse von DNA-Sequenzen erfolgt mit einem Kapillarsequenzierer der Firma Applied Biosystems (siehe 2.9) und entsprechender Software (SeqScape oder Sequence Scanner 1.0, siehe 2.9).

Das Prinzip der Sequenzierung basiert auf Kettenabbruch bei der DNA-Verlängerung durch Dideoxynukleotide (ddNTP). Nach dem Einbau von markierten Dideoxynukleotiden in die DNA während der PCR, kann die Polymerase aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe den DNA-Strang nicht weiter verlängern, es kommt folglich zum Kettenabbruch. Es werden vier verschiedene PCR-Ansätze benötigt, die jeweils alle Deoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), aber nur ein Dideoxynukleotid (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) enthalten. Die DNA-Synthese bricht an verschiedenen Stellen ab und es entstehen unterschiedlich lange Fragmente, die auf einem Gel aufgetragen und ausgewertet werden können (Sanger et al., 1977).

Vor dem eigentlichen *Cycle Sequencing* müssen Primer des PCR-Produktes mit Hilfe von Exonuklease I (EXO) abgebaut und überschüssige Nukleotide mittels alkalischer Phosphatase (*Antarctic Alkaline Phosphatase*, AAP, siehe 2.4) inaktiviert werden:

1 µl PCR-Produkt (40ng)

0,1 µl EXO

0,25 µl AAP

Ad 5 µl Millipore H₂O

5 µl Gesamtvolumen

Die Reaktion läuft unter folgenden Bedingungen ab:

1. Enzymaktivität: 15 min, 37° C
2. Enzyminaktivierung: 15 min, 80 °C

Für das *Cycle Sequencing* wird folgender Ansatz benötigt, der zu obigem 5 µl-Ansatz pipettiert wird:

2 µl 5x Puffer

1 µl Primer (*forward* oder *reverse*)

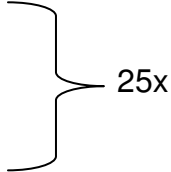
0,3 µl BigDye (siehe 2.6)

1,7 µl Millipore H₂O

5 µl Gesamtvolumen

Es ergibt sich in der Summe ein Endvolumen von 10 µl.

Das Programm des *Cycle Sequencing* läuft wie folgt ab:

1. Initiale Denaturierung: 2 min, 96 °C
 2. Denaturierung: 30 sec, 96 °C
 3. Annealing: 30 sec, 55 °C
 4. Elongation: 3 min, 60 °C
 5. Finale Elongation: 5 min, 60 °C
- 

Anschließend muss die DNA zuvor mit Hilfe von Natriumacetat (NaAc) und Ethanol (EtOH) gefällt werden (siehe 2.5). Dazu wird nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- 2 µl NaAc zum PCR-Produkt, gut mischen
- 50 µl EtOH (95%) dazu, mischen
- 20 min bei 4200 rpm zentrifugieren
- Überstand rasch und vollständig abheben
- 50 µl EtOH (70%) dazu
- 15 min bei 4200 rpm zentrifugieren
- Überstand rasch und vollständig abheben
- Präzipitat in 15 µl HiDi-Formamid aufnehmen

Schließlich erfolgt die eigentliche Sequenzierung im Kapillarsequenzierer. Das Ergebnis kann mittels SeqScape oder Sequence Scanner 1.0 graphisch dargestellt und ausgewertet werden.

3.2.10 *Exon-trapping*

Als *Exon-trapping*-Vektor diente der pSPL3B-Vektor, der sich durch die Abwesenheit der Nukleotide 1311 bis 1548 vom pSPL3-Vektor unterscheidet. Diese Nukleotide beinhalten eine sogenannte kryptische *splice site*, das heißt es wurde oft ein unerwünschtes Exon des Vektors mitgespleißt, das im Endprodukt nicht auftauchen sollte (Burn et al., 1995).

Die zu klonierende DNA-Sequenz besteht jeweils aus ein oder zwei Exonen eines Gens mit circa 50 flankierenden Basen der angrenzenden Introne. Es wurden jeweils Wildtyp- und mutierte Sequenz eines Exons verwendet, um einen Vergleich zwischen dem Spleißverhalten ziehen zu können.

3.3 *Transfektion von Cos 7-Zellen*

Die Transfektion von Zellen bezeichnet das Einbringen von Plasmiden in eukaryotische Zellen. Grundsätzlich lassen sich zwei Arten von Transfektionen unterscheiden, nämlich transiente und stabile Transfektion. Die stabile unterscheidet sich von der transienten Transfektion dadurch, dass die aufgenommene DNA in das Genom der Zelle integriert und damit nicht abgebaut wird. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist aber gering. Üblicherweise wird die DNA nicht in das Genom der Zelle aufgenommen und innerhalb von wenigen Tagen beseitigt, das heißt die Zelle wurde transient transfiziert. Aufgrund der begrenzten Verweildauer der DNA muss die Analyse deshalb schnell erfolgen (Mülhardt, 2003).

Es gibt vielfältige Transfektionsmethoden, die sich auch in ihrer Effizienz unterscheiden. Für diese Arbeit wurden zwei Transfektionsreagentien verschiedener Firmen mit gleicher Wirkungsweise verwendet. Laut Hersteller bildet das Reagenz einen Komplex mit der zu transfizierenden DNA und wird dann in die Zelle transportiert. Der Vorteil der Reagenzien besteht in einer hohen Effizienz und geringer Toxizität gegenüber den Zellen.

Für das ABCA4-Gen wurde FuGENE 6 (siehe 2.6) nach folgendem Protokoll verwendet:

Eine 10 cm-Schale (siehe 2.8) sollte zu 50% mit zu transfizierenden Cos 7-Zellen (siehe 2.1) bewachsen sein. 20 µl FuGENE 6-Reagenz werden zu 470 µl DMEM-Medium (siehe 2.7) gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei muss bei Zugabe des Reagenz darauf geachtet werden, nicht die Plastikwand des Behälters zu berühren, um eine möglichst hohe Ausbeute zu bekommen. Anschließend wird 10 µg Plasmid-DNA hinzugefügt. Nach fünfzehn- bis zwanzigminütiger Inkubation, ebenfalls bei Raumtemperatur, wird der Mix tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert, wobei die 10 cm-Schale kontinuierlich geschwenkt wird.

Für die Analyse der DNA des VMD2-Gens wurden anstatt 10 cm-Schalen 6 Well Platten (siehe 2.8), ebenfalls zu 50% bewachsen, benutzt. Entsprechend werden 200 µl DMEM-Medium (siehe 2.7), 3 µl Transfektionsreagenz, in diesem Fall *TransIT-LT1* transfection reagent (siehe 2.6) und 1,5 µg Plasmid-DNA eingesetzt und ansonsten nach obigem Protokoll vorgegangen.

Nach 18 bis 72 Stunden im Brutschrank (siehe 2.9) kann die Analyse der gewünschten RNA (siehe 3.4.3) erfolgen.

3.4 RNA

Im Umgang mit RNA ist besonders auf RNase-freie Materialien zu achten, da RNA-hydrolysierende Ribonukleasen, sogenannte RNasen, ubiquitär vorkommen und äußerst stabil sind (Mülhardt, 2003). Deshalb sollte auf RNase-freie Bedingungen geachtet und auf Eis gearbeitet werden.

3.4.1 RNA-Isolierung

Mithilfe des RNeasy Mini Kits von Qiagen (siehe 2.6) kann Gesamt-RNA, das heißt unter anderem ribosomale RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA) und *messenger* RNA (mRNA), aus Cos 7-Zellen isoliert werden. Zuvor wurde die Zellmasse mittels QIAshredder (siehe 2.6) homogenisiert. Die RNA-Isolierung wird laut Herstelleranleitung der beiden Kits durchgeführt und die RNA in 30 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert. Obwohl die zu analysierende mRNA nur einen Anteil von etwa 2% an der Gesamt-RNA hat, reicht die Menge für die weitere Analyse aus (Mülhardt, 2003).

3.4.2 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die RNA-Konzentration einer Lösung kann, wie die DNA-Konzentration (siehe 3.2.5), mit Hilfe eines Spectrophotometers (NanoDrop, siehe 2.9) ermittelt werden. RNA-Basen zeigen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Extinktion von eins entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Als Referenz wird Nuklease-freies Wasser eingesetzt.

3.4.3 Reverse Transkription (*complementary* DNA-Synthese)

Mithilfe einer Reversen Transkriptase namens M-MuLV-RT, einem Enzym aus dem *Moloney murine leukemia virus* (M-MuLV), wird die Reverse Transkription (RT) oder *complementary* DNA-Synthese (cDNA-Synthese) durchgeführt (Mülhardt, 2003). Das Enzym ist Bestandteil eines Kits, dem First-strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas (siehe 2.6). Dieser Schritt ist notwendig, da die gewonnene RNA nicht direkt als Template für die anschließende PCR verwendet werden kann. Bei der Reversen Transkription wird die zuvor gewonnene RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt. Als Primer werden Oligo-(dT)₁₈-Primer, ebenfalls im Kit enthalten, benutzt. Diese binden an den Poly-A⁺-Schwanz spezifisch von mRNA, weshalb sie aber bei langen mRNAs an ihre Grenzen stoßen, da Reverse Transkriptasen nur 1-2 kb cDNA synthetisieren können. Grundsätzlich können auch andere Primer angewendet werden, wie zum Beispiel Hexamerprimer, die an zufälligen Stellen an RNA binden, so dass schließlich auch alle Bereiche der mRNA in cDNA umgeschrieben sind (Mülhardt, 2003).

Die cDNA-Synthese wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 100 ng – 5 µg Gesamt-RNA
- 1 µl Oligo-(dt)₁₈-Primer (0,5 µg)
- x µl Nuklease-freies Wasser ad 12,5 µl
- 5 min Inkubation bei 70 °C, dann auf Eis stellen
- 4 µl 5x Reaktionspuffer für Reverse Transkriptase
- 2 µl dNTP Mix (je 10mM)
- 0,5 µl Nuklease-freies Wasser
- 5 min Inkubation bei 37 °C
- 1 µl RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase (200U/ µl)
- 60 min Inkubation bei 42 °C
- Reaktion stoppen: 10 min bei 70 °C

cDNA kann bei -20° Celsius gelagert werden.

3.4.4 Reverse Transkription-Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR)

Die Reverse Transkription-Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) dient der Vervielfältigung von cDNA. Die Funktionsweise einer PCR wurde bereits in Abschnitt 3.2.1 besprochen, sie gilt ebenso für die RT-PCR.

Der Reaktionsansatz für eine RT-PCR setzt sich wie folgt zusammen:

5 µl 10xPuffer (0,2M Tris-HCl pH8,4, 0,5M KCl)
2 µl Formamid
0,5-1 µl MgCl₂ (50mM)
4 µl dNTP (10mM)
2 µl Forward-Primer (10pmol/ µl) (SD2 oder SD6)
2 µl Reverse-Primer (10pmol/ µl) (SA4 oder SA2)
0,4 µl Taq-Polymerase
4 µl Template-cDNA
Ad 50 µl H₂O
50 µl Gesamtvolumen

Die RT-PCR läuft unter folgenden Bedingungen ab (*Touch down*):

- | | | |
|---|---|-----|
| 1. Initiale Denaturierung: 2 min, 96 °C | } | 3x |
| 2. Denaturierung: 30 sec, 96 °C | | |
| 3. Annealing: 30 sec, 56/64 °C | | |
| 4. Elongation: 30 sec-2 min 72 °C | } | 3x |
| 5. Denaturierung: 30 sec, 96 °C | | |
| 6. Annealing: 30 sec, 53/61 °C | | |
| 7. Elongation: 30 sec-2 min 72 °C | } | 25x |
| 8. Denaturierung: 30 sec, 96 °C | | |
| 9. Annealing: 30 sec, 50/58 °C | | |
| 10. Elongation: 30 sec, 2 min 72 °C | } | |
| 11. Finale Elongation: 5 min 72 °C | | |

Je nach Schmelztemperatur der Primer beträgt die Annealing-Temperatur 56°/53°/50° Celsius für das Primerpaar SD6 und SA2 und 64°/61°/58° Celsius für SD2 und SA4.

Die Analyse des PCR-Produktes erfolgt gemäß Abschnitt 3.2.3.

3.5 Software

3.5.1 BDGP *splice site prediction by neural network*

Bei BDGP (*Berkeley Drosophila Genome Project*) handelt es sich um ein Konsortium des *Drosophila Genome Centers*, das unter anderem Tools zu Verfügung stellt, um Eigenschaften von DNA-Sequenzen zu identifizieren. Für diese Arbeit wurde das *splice site prediction*-Tool verwendet. Es dient dazu, Exon-Intron-Grenzen innerhalb eines DNA-Abschnittes zu erkennen. Dazu wird je ein *neural network* für *donor*- und *acceptor*-Spleißstelle benutzt. Das Ergebnis des *networks* für eine potentielle Spleißstelle wird als Wert zwischen 0,1 und 1,0 angegeben, wobei die Spleißstelle umso stärker ist, umso höher der Wert. Auf diese Weise lassen sich Vorhersagen treffen, ob und wie eine DNA-Sequenz gespleißt wird. Die *BDGP splice site prediction* dient in dieser Arbeit dem Vergleich von bioinformatischen Vorhersagen und Ergebnissen aus *in vitro*-Experimenten (Reese et al., 1997).

3.5.2 *Splice score calculation*

Das excel-basierte Programm "*Splice score calculation*" errechnet einen Wert für eine eingegebene *acceptor splice site*- oder *donor splice site*-Sequenz, der einen Hinweis darauf gibt, ob es sich dabei um eine starke oder schwache *splice site* handelt. Je niedriger der Wert, desto höher wird die Wahrscheinlichkeit angesehen, dass sie *in vivo* als solche erkannt wird; reale *acceptor splice sites* besitzen einen Wert zwischen 0 und 20 und reale *donor splice sites* liegen zwischen 0 und 11.

Bei der Entwicklung von "*Splice score calculation*" wurde für 764 *splice sites* berechnet, wie häufig bestimmte Basen in direkter Nachbarschaft zur 3' oder 5' *splice site* vorkommen. Hat die eingegebene Sequenz viele Übereinstimmungen mit Basen, die sich am häufigsten in der Nachbarschaft der 764 betrachteten befinden, handelt es sich vermutlich um eine starke *splice site*. Bei der Entwicklung des Programms wurde auf folgende Literatur zurückgegriffen: Penotti (1991), Berg & von Hippel (1987).

3.5.3 ESEfinder 2.0

Bei ESEfinder handelt es sich um ein web-basiertes Programm, das es ermöglicht, ESE-Sequenzen innerhalb eines Exons anhand von Matrizen zu identifizieren. Diesen ESE können vier verschiedene SR-Proteine zugeordnet werden: SF2/ASF, SC35, SRp40 und SRp55. Es werden Werte für gefundene ESE angegeben (*high scores*), die über einem bestimmten Schwellenwert liegen und von denen man annimmt, dass sie signifikant sind. Diese Schwellenwerte liegen, je nach SR-Protein, zwischen 1,956 und 2,676.

Es besteht auch die Möglichkeit, vorherzusagen, ob Mutationen diese Elemente verändern. Wird zum Beispiel durch eine Mutation ein ESE in diesem Modell zerstört, so könnte sich dies *in vivo* durch *Exon-skipping* bemerkbar machen.

Trotzdem schränken die Macher dieses Programms ein, dass nicht alle als ESE identifizierten Sequenzen in Wirklichkeit auch existieren, noch dass die errechneten

high scores der ESE mit der ihrer Stärke korrelieren. Zur sicheren Identifikation sei immer noch ein experimenteller Nachweis nötig (Cartegni et al., 2003).

4. Ergebnisse

Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit dargestellt werden. Dabei wird erst auf Mutationen, die das ABCA4-Gen betreffen, Bezug genommen, um anschließend auf Mutationen im VMD2-Gen einzugehen.

4.1 ABCA4-Mutationen

Bei Patienten, bei denen im Rahmen der diagnostischen Abklärung von Morbus Stargardt das ABCA4-Gen sequenziert wurde, konnten Mutationen in diesem Gen detektiert werden. Sieben dieser Mutationen, die in folgender Tabelle in gleicher Reihenfolge aufgeführt sind, wie sie im nächsten Abschnitt abgehandelt werden, wurden für diese Arbeit zur genaueren Analyse ausgewählt.

Mutationen	DNA-Sequenz
IVS25+9G>C c.3813+9G>C (Exon 25)	<pre> gaattcggtaaacctcacagtcctccagtttcttgaaaaacagagctggcatcagtccttt tcttctgctctagGGGATGTAAATGAGCTGATGGATGTAGTTCTCCACCATGTTCCAGAG GCAAAGCTGGTGGAGTGCATTGGTCAAGAACTTATCTTCCTTCTTCCAAATAAGAACTT CAAGCACAGAGCATATGCCAGCCTTTTTCAGAGAGCTGGAGGAGACGCTGGCTGACCTTG GTCTCAGCAGTTTTTGGAAATTTCTGACACTCCCCTGGAAGAGgtaaagtaagattccag ctggtttctgtcaagtgcagaaagtggcggttctttgaaaaagtctaaccattagagcaa agttttgtaaaagcaaaaagccatcgttcccggattc </pre>
IVS2-1G>A c.161-1G>A (Exon 3)	<pre> gaattccctgcttgggtctccatgactaatacccgtcttctgctcattttctgttttaaa GCCATTTCCCAACAAGGCGATGCCCTCAGCAGGAATGCTGCCGTGGCTCCAGGGGATC TTCTGCAATGTGAACAATCCCTGTTTTCAAAGCCCCACCCAGGAGAATCTCTGGAAT TGTGTCAAACATAACAACCTCCATgtaagtgttgagatccctaccatgcaggggaggaa gttgacacacccttcacgtggatcc </pre>
c.6147G>A (Exon 44)	<pre> ...cactccttgaaggatactcagtaattgcttttttcttgcagTATTTTAACCAATATT TCTGAAGTCCATCAAAATATGGGCTACTGTCTCAGTTTGATGCAATTGATGAGCTGCT CACAGGACGAGAACATCTTTACCTTTATGCCCGGCTTCAGAGGTGACCAGCAGAAGAAA TCGAAAAGgtgaaaaatgttttgttggccacataggagctctggttaattacaagcct gtttcatgagagtgcattggatcc </pre>
IVS40+5G>A c.5714+5G>A (Exon 40)	<pre> ...caggtctgtgggtgagctggggcggtgaagtggactcaattcctgttgatgccag GTGAGGAGCACTCTGCAAAATCCGTTCCACTGGGACCTGATTGGGAAGAACTGTTTGCC ATGGTGGTGGAAAGGGGTGGTGTACTTCTCTGACCCTGCTGGTCCAGCGCCACTTCTT CCTCTCCCAATgtacgtccatgccacaccctgggccaagtgggcagctcagggcatcca gaggatcc </pre>
IVS8+3A>C c.1099+3A>C (Exon 8)	<pre> gaattcagattatgactctagctgccttaaaataaacctgaagactttgccttgccctag TTTATCCATCGGCCGAGTATGCAGGACTTGCTGTGGGTGACCAGGCCCTCATGCAGAA TGGTGGTCCAGAGACCTTTACAAAGCTGATGGGCATCCTGTCTGACCTCCTGTGTGGCT ACCCGAGGAGGTGGCTCTCGGGTGTCTCCTTCAACTGGTATGAAGACAATAACTAT AAGGCCTTTCTGGGGATTGACTCCACAAGGAAGGATCCTATCTATTCTTATGACAGAAG AACAAgttagttttctgagtcctgcttataaattggcctctcatgttggttaagttgat ggtttaacacttctaggtgaaaccaaacctggggatc </pre>
IVS10+1G>T c.1356+1G>T (Exon 10)	<pre> gaattcccaaaagtctctctcactttttctctctgttctgtctctgtcttgcctctg tctggttttagGCCAACTCAACTTTTGAAGAACTGGAACACGTTAGGAAGTTGGTCAAA GCCTGGGAAGAAGTAGGGCCCCAGATCTGGTACTTCTTTGACAACAGCACACAGATGAA CATGATCAGAtaaggggggttgaggatggggaggggagggagggaggaagcgggtggg ggcaagaaagtccacttggttccctttccagatc </pre>

IVS9-5G>A
c.1240-5G>A
(Exon 9)

```
gaattcagttacaagcaatggggagtttctgtaaaaatctgtcccttgtctcctgcagC
ATCCTTTTGTAAATGCATTGATCCAGAGCCTGGAGTCAAATCCTTTAACC AAAATCGCTT
GGAGGGCGGCAAAGCCTTTGCTGATGGGAAAAATCCTGTACACTCCTGATTCACCTGCA
GCACGAAGGATACTGAAGAATgtaagatcccagctgggcttgcccttgtgtaccctggac
ctcccagagatatc
```

Tabelle 12: Mutationen im ABCA4-Gen

In der linken Spalte steht die Bezeichnung der Mutation und in Klammern das Exon, das mittels Exon-trapping untersucht wurde.

Die rechte Spalte zeigt die DNA-Sequenzen, die in den Vektor kloniert wurden. Nicht vollständig abgebildet sind die Sequenzen, deren Mutationen Exon 44 und Exon 40 betreffen, da bei diesen aus praktischen Gründen ein Abschnitt kloniert wurde, der Exon 43 und 44, beziehungsweise Exon 39 und 40 umfasst. Flankierende Introns sind in Kleinbuchstaben dargestellt.

Grün gekennzeichnete Basen heben EcoRI-Schnittstellen, orange BamHI-Schnittstellen und blaue EcoRV-Schnittstellen hervor.

Exone sind markiert durch Großbuchstaben und grauen Hintergrund. Die Base, die von der Mutation betroffen ist, ist rot hinterlegt.

4.1.1 IVS25+9G>C: Keine Auswirkung auf Spleißen *in vitro*

Mutation IVS25+9G>C diente als Negativkontrolle. Es konnte in einer vorhergehenden Arbeit mittels *Exon-trapping*-Analyse schon einmal gezeigt werden, dass sie keine Auswirkung auf den Spleißvorgang hat. Die Analyse der cDNA und anschließende Sequenzierung des PCR-Produktes zeigt, dass Wildtyp-cDNA (wt-DNA) und mutante cDNA sich nicht voneinander unterscheiden. Es wurden sowohl Exon 1 und 2 des pSPL3B-Vektors, als auch Exon 25 des ABCA4-Gens korrekt gespleißt (siehe Abbildung 4).

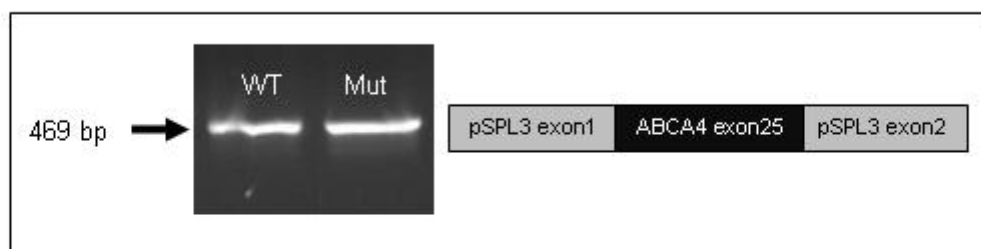


Abb. 4: cDNA ABCA4 Exon 25

WT: Wildtyp-cDNA, Mut: mutante cDNA. Das Schema rechts verdeutlicht, aus welchen Exonen sich die cDNA beider Produkte zusammensetzt.

Vergleicht man die bioinformatischen Daten (BDGP *splice site prediction* und *Splice score calculation*, siehe 2.9) von wt-DNA und mutanter DNA, ergibt sich kein Hinweis

auf ein mögliches differentielles Spleißverhalten der beiden Sequenzen. Die bioinformatische Vorhersage stimmt also mit dem Ergebnis des *in vitro*-Experimentes überein.

4.1.2 IVS2-1G>A: Deletion einer Base

Die Mutation IVS2-1G>A betrifft das Guanin der 3' *splice site*, weshalb ein Effekt auf das Spleißen zu erwarten war. Der Effekt der Mutation zeigt sich jedoch erst bei der Sequenzierung, die cDNA von Wildtyp und Mutante offenbart keinen sichtbaren Unterschied im Gellaufverhalten (siehe Abbildung 5).

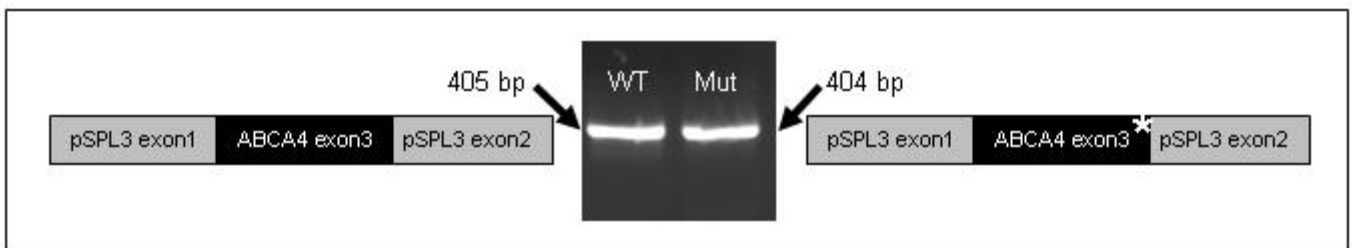


Abb. 5: cDNA ABCA4 Exon 3

Das Schema links gibt die Zusammensetzung der wt-cDNA wieder, rechts die der mutanten cDNA. Das Sternchen deutet die Deletion in der cDNA der Mutante an.

IVS2-1G>A führt nicht zu *Exon-skipping*, jedoch zu einer Deletion in der RNA (r.161delG), so dass daraus eine Leserasterverschiebung (*out of frame*-Mutation) resultiert. Auf Proteinebene bedeutet dies wahrscheinlich, dass in das Genprodukt des ABCA4-Gens an Stelle des Serins im Codon 54 ein Cystein eingebaut wird. Dies würde nach dem weiteren Einbau von 23 fremden Aminosäuren zu einem Kettenabbruch führen, da als vierundzwanzigste Aminosäure ein Stopcodon (TGA) entsteht (p.Cys54SerfsX24). Laut dieser theoretischen Überlegungen, die praktisch im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft werden konnten, führt diese Mutation zu einem verkürzten und somit dysfunktionalen Protein.

Die Analyse der bioinformatischen Daten zeigt, dass durch die Mutation eine neue *splice site* entsteht, die die erste Base (Guanin) von Exon 3 in die *splice site* mit einbezieht, so dass es zur Deletion in der RNA kommt. Die BDGP *acceptor site prediction* sagt voraus, dass diese mit einem Wert von 0,23 sehr viel schwächer ist als die ursprüngliche (0,85), so dass man nicht erwarten würde, dass die ganze DNA

vollständig gespleißt wird. In diesem Punkt stimmt die bioinformatische Information also nicht mit dem *in vitro*-Ergebnis überein. *Splice score calculation* berechnet für die ursprüngliche Akzeptorspleißstelle einen Wert von 6,234 und für die neu entstandene 8,701. Sie ist somit schwächer.

4.1.3 c.6147G>A und IVS40+5G>A: *Exon-skipping*

Aus praktischen Gründen wurden zur Überprüfung der Mutation c.6147G>A Primer verwendet, die Exon 43 mit einbeziehen, was das Ergebnis aber nicht beeinflussen sollte. Sie betrifft die letzte Base von Exon 44 und liegt somit sehr nahe der 5' *splice site*. Abbildung 6 zeigt, dass durch c.6147G>A das Exon vom Spleißosom nicht erkannt werden konnte und so übersprungen wurde, es kam zum sogenannten *Exon-skipping*.



Abb. 6: cDNA ABCA4 Exon 43-44

Das Schema rechts oben verdeutlicht die Zusammensetzung der wt-cDNA, rechts unten der mutanten cDNA. Die Differenz zwischen den beiden Banden beträgt 142 bp und entspricht der Länge von Exon 44.

Laut BDGP *splice site prediction* wird durch die Mutation die 5' *splice site* stark geschwächt (Wert unter 0,1). Auch die *Splice score calculation* ergibt eine Schwächung (3,816 für wt-DNA, 5,9 für mutante DNA). Die bioinformatischen Daten stimmen also mit dem oben beschriebenen Ergebnis überein.

Bei Mutation **IVS40+5G>A** wurde, aus demselben Grund wie bei c.6147G>A, ein weiteres Exon mit amplifiziert, in diesem Fall Exon 39. Diese Mutation wurde schon in der Literatur beschrieben (Rivera et al., 2000) und diente als Positivkontrolle. Betrachtet man Abbildung 7, erkennt man, dass die mutante cDNA zwei Banden

aufweist, davon eine auf Höhe der Bande der wt-DNA. Die untere Bande entspricht cDNA ohne Exon 40, die obere hingegen enthält dieses Exon. Das bedeutet, dass die *splice site* zwar abgeschwächt wurde, aber trotz Mutation partiell noch immer vom Spleißosom erkannt wird, so dass nur ein Teil der mRNA korrekt gespleißt werden konnte.



Abb. 7: cDNA ABCA4 Exon 40

Das Schema rechts oben erklärt die Zusammensetzung der wt-cDNA und der oberen Bande der cDNA der Mutante. Rechts unten das Schema der unteren Bande der mutanten cDNA. Die Differenz der beiden Banden von 130 bp gibt die Größe von Exon 40 wieder.

Bei der Analyse der bioinformatischen Daten fällt auf, dass in der wt-DNA neben der natürlichen 5' *splice site* (BDGP-Wert: 1,0) noch eine weitere starke besteht, die von den ersten beiden Basen (GT) von Exon 40 gebildet wird (BDGP-Wert: 0,99). Diese zweite *donor splice site* bleibt durch die Mutation unverändert, wohingegen die natürliche *splice site* mit einem Wert von 0,68 schwächer wird, was sich auch in einem Dosisunterschied bei der mutanten cDNA bemerkbar macht. Es entsteht mehr cDNA ohne, als mit Exon 40 (Abbildung 7). Es lässt sich jedoch nicht überprüfen, ob diese zusätzliche starke *donor splice site* tatsächlich auch benutzt wird, obwohl sich keine Basen dazwischen befinden. Dagegen spricht, dass die wt-cDNA vollständig korrekt gespleißt worden ist, trotz der Tatsache, dass laut der bioinformatischen Vorhersage zwei nahezu identisch starke *donor splice sites* existieren. *Splice score calculation* berechnet für die Donorspleißstelle der Mutante einen schwächeren Wert als für den Wildtyp (3,61 für wt-DNA, 6,069 für mutante DNA) und stimmt somit mit dem experimentellen Ergebnis überein.

4.1.4 IVS8+3A>C und IVS10+1G>T: *Exon-skipping* und Aktivierung einer kryptischen *splice site*

Im folgenden Abschnitt werden wiederum zwei Mutationen betrachtet, deren Ergebnisse vergleichbar sind.

Mutation IVS8+3A>C führt dazu, dass zwei Spleißvarianten entstehen, die sich beide von dem Spleißprodukt der wt-cDNA unterscheiden (Abbildung 8). Mittels Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass die cDNA der oberen Bande der Mutante nur einen Teil von Exon 8 enthält. Es wurde zwar die gleiche *acceptor splice site*, jedoch eine andere *donor splice site* benutzt, als dies beim Wildtyp der Fall ist. Es handelt sich also um die Aktivierung einer kryptischen *splice site*. Diese befindet sich inmitten des Exon 8, was dazu führt, dass ein Teil dieses Exons, insgesamt 83 Basenpaare, nicht mitgespleißt wird. Die zweite Spleißvariante enthält nur die zwei Exone des Vektors, das heißt, bei einem Teil der mutanten DNA kam es zum *Exon-skipping*. Die Mutation hat die ursprüngliche *splice site* so geschwächt, dass sie nicht mehr als solche erkannt wird.

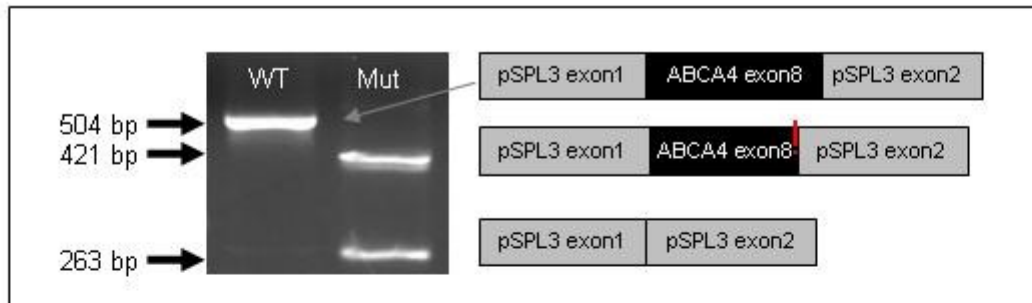


Abb. 8: cDNA ABCA4 Exon 8

Das Schema rechts oben bildet die wt-cDNA ab, die Schemata darunter jeweils die Spleißvarianten der mutanten cDNA. Das rote Ausrufezeichen soll auf den Unterschied zwischen WT und Mut (obere Bande) hinweisen, das heißt auf die Unvollständigkeit von Exon 8 der mutanten cDNA.

Dieses Ergebnis stimmt mit den von BDGP *splice site prediction* ermittelten Daten überein. Danach besitzt die wt-DNA zwei *donor splice sites* mit einem BDGP-Wert von 0,99 für die natürliche und 0,83 für die *splice site* innerhalb von Exon 8. Durch die Mutation wird die natürliche Spleißstelle abgeschwächt (0,50), während die andere unverändert bleibt. Es bleibt dennoch zu beachten, dass trotz dieses hohen Wertes von 0,83, der eine starke *splice site* vermuten lässt, nicht die komplette

mutierte mRNA auf diese Weise gespleißt wurde, sondern Exon 8 auch teilweise übersprungen wurde.

Eine weitere Mutation, die das Phänomen einer kryptischen *splice site* aufweist, ist **IVS10+1G>T**. Zuvor ist anzumerken, dass mit Einfügen der *EcoRV*-Schnittstelle eine starke *acceptor splice site* hinzugefügt wurde, die sich mit einer kryptischen *donor splice site* innerhalb der intronischen Sequenz des Vektors ergänzt, und so ein unerwünschtes Exon mit einer Länge von 94 Basenpaaren entstanden ist. Dieses Exon taucht in allen Spleißvarianten auf, beeinflusst aber nicht die Aussage der Ergebnisse.

Da IVS10+1G>T das Guanin der 5' *splice site* betrifft, war zu erwarten, dass es zu einer Abweichung beim Spleißen kommt. Aus Abbildung 9 wird ersichtlich, dass dies *in vitro* auch der Fall ist, da die von der Mutation betroffene Spleißstelle nicht verwendet wird. Es sind zwei mutante cDNA-Spleißvarianten entstanden, wobei die obere Bande wiederum nur einen Teil des Exons enthält, da eine kryptische *donor splice site* innerhalb von Exon 10 aktiviert wurde. Auf diese Weise gehen 40 Basenpaare verloren. Die untere Bande besteht, wie bei IVS8+3A>C, aus den beiden Exonen des pSPL3B-Vektors. Beachtenswert ist der Dosisunterschied zwischen den beiden PCR-Produkten der mutanten cDNA, der anzeigt, dass Exon 10 tendentiell öfter übersprungen wird, als es gespleißt wird.

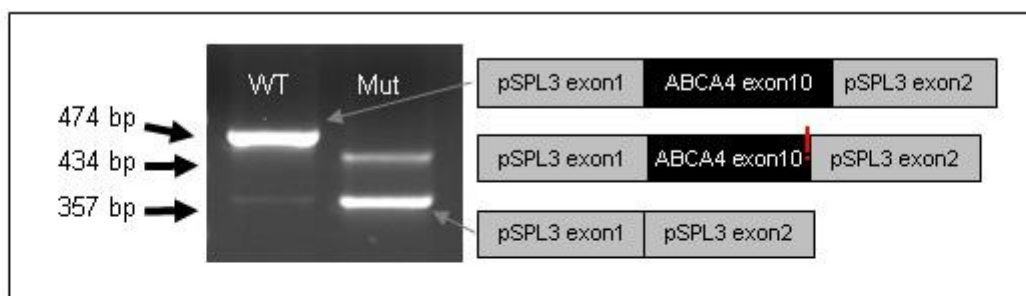


Abb. 9: cDNA ABCA4 Exon 10

Die grauen Pfeile ordnen dem jeweiligem PCR-Produkt das dazugehörige Schema zu. Das rote Ausrufezeichen markiert den Verlust eines Teils von Exon 10 in der Spleißvariante der Mutante.

Bioinformatisch betrachtet ließ sich dieser Sachverhalt schon im Voraus vermuten. Nach den BDGP-Berechnungen wird die natürliche 5' *splice site* (BDGP-Wert: 0,91)

durch die Mutation komplett zerstört und es tritt die kryptische Spleißstelle innerhalb von Exon 10 mit einem Wert von 0,27 in den Vordergrund. Dass diese nur sehr schwach ist, spiegelt sich auch in Abbildung 9 (obere Bande der mutanten cDNA) wider, da nur eine geringe Menge an cDNA das verkürzte Exon enthält. Auch die ermittelten Werte der *Splice score calculation* bestätigen das Ergebnis.

4.1.5 IVS9-5G>A: Verbessertes Spleißen

Wurde bis hierhin das korrekte Spleißen durch Mutationen fast ausschließlich negativ beeinflusst, zeigt das Beispiel von IVS9-5G>A, dass auch das Gegenteil der Fall sein kann, wobei man dieses Ergebnis in Hinblick auf die Abbildung von *in vivo*-Verhältnissen durch *in vitro*-Experimente besonders kritisch beurteilen muss.

Abbildung 10 zeigt, dass die wt-cDNA zum größten Teil kein Exon 9 enthält, nur eine schwache Bande deutet PCR-Produkt mit korrekt gespleißtem Exon an. Diese Bande fällt bei der mutanten cDNA etwas stärker aus, das heißt, es wurde mehr mRNA richtig gespleißt. Um die Richtigkeit dieses Ergebnisses zu überprüfen, wurde das Experiment zweimal unabhängig voneinander durchgeführt und eine Verwechslung der Proben ausgeschlossen.

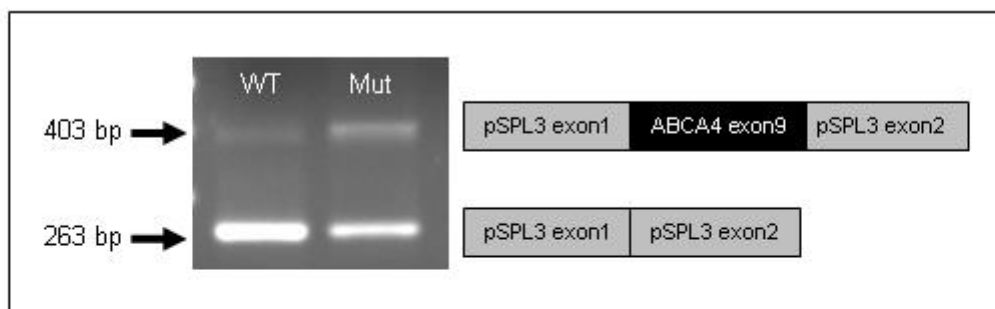


Abb. 10: cDNA ABCA4 Exon 9

Die Schemata rechts geben jeweils die Zusammensetzung von wt- und mutanter cDNA wieder.

Dieses Ergebnis verwundert umso mehr, wenn man die bioinformatischen Informationen zum Vergleich heranzieht. Zwar wird sowohl von BDGP *splice site prediction* als auch mit Hilfe von *Splice score calculation* eine relativ schwache *acceptor splice site* berechnet (BDGP-Wert für wt-DNA: 0,51 und für mutante DNA:

0,49; *Splice score calculation* für wt-DNA: 5,650 und für mutante DNA: 5,713), was aber nicht vermuten lässt, dass nur so wenig cDNA entstanden ist, die Exon 9 enthält. Zudem stehen diese Daten im Widerspruch zum *in vitro*-Modell, da sie keine Verbesserung der Spleißstelle durch die Mutation andeuten.

4.1.6 Übersicht über die Ergebnisse des ABCA4-Projektes:

Mutation	Ergebnis der BDGP <i>splice site prediction</i>	<i>In vitro</i> -Ergebnis	Vergleich BDGP <i>splice site prediction</i> und <i>in vitro</i> - Ergebnis
IVS25+9G>C	Kein Unterschied zwischen wt- und mutanter Sequenz	Kein Unterschied zwischen wt- und mutanter Sequenz	Übereinstimmung
IVS2-1G>A	Mut: ursprüngliche Akzeptorspleißstelle geht verloren; neue, sehr schwache Akzeptorspleißstelle, die zu Deletion führt	Mut: Deletion einer Base, Konsequenz: <i>out of frame</i> -Mutation	Teilweise Übereinstimmung
c.6147G>A	Mut: Starke Schwächung der ursprünglichen Donorspleißstelle	Mut: <i>Exon-skipping</i> , Konsequenz: Verlust von Exon 44	Übereinstimmung
IVS40+5G>A	Mut: Schwächung der ursprünglichen Donorspleißstelle	Mut: Teilweise <i>Exon-skipping</i> , Konsequenz: Verlust von Exon 40 in einem Transkript	Übereinstimmung
IVS8+3A>C	WT und Mut: starke zusätzliche Donorspleißstelle in Exon 8; Mut: ursprüngliche Donorspleißstelle geschwächt, zusätzliche bleibt bestehen (kryptische Spleißstelle)	Mut: Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle und <i>Exon-skipping</i> , Konsequenz: Verlust von Exon 8 in einem der Transkripte, verkürztes Exon 8 im anderen Transkript	Teilweise Übereinstimmung

IVS10+1G>T	WT und Mut: schwache zusätzliche Donorspleißstelle in Exon 10; Mut: ursprüngliche Donorspleißstelle zerstört, zusätzliche bleibt bestehen (kryptische Spleißstelle)	Mut: Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle und <i>Exon-skipping</i> , Konsequenz: Verlust von Exon 10 in einem Transkript, verkürztes Exon 10 im anderen Transkript	Übereinstimmung
IVS9-5G>A	Mut: geringe Schwächung der Akzeptorspleißstelle	Mut: verbessertes Spleißen	Keine Übereinstimmung

Tabelle 13: Übersicht über Ergebnisse für ABCA4-Mutationen

4.2 VMD2-Mutationen

Die Mutationen, die im VMD2-Gen auf ihren Einfluss auf das Spleißen untersucht werden sollten, befinden sich alle im gleichen Exon, nämlich Exon 4 (siehe Tabelle 14). Es handelt sich in sechs Fällen um DNA von Patienten mit Morbus Best und in einem Fall um DNA von einem ADVIRC-Patienten. In Tabelle 15 ist die Aminosäureposition im Genprodukt ergänzt, die von der Mutation betroffen ist. Alle Mutationen sind in der VMD2-Datenbank der Universität Regensburg (http://www-huge.uni-regensburg.de/VMD2_database/) registriert.

Mutationen	DNA-Sequenz Exon 4 (VMD2)
c.256G>A (ADVIRC)	<pre> g a a t t c c g c t c g c a g c a g a a a g c t g g a g g a g c c g a g g c a t c g c c g g g c g c t g g g c c c t g g g c t c t g g c c g c a g c c t g g c c c c t c g c c c c t c g c c c c c g c c c c t c c t g c c c a g G C T T C T A C T G A C G C T G G T C G T G A C C C G C T G G T G G A A C C A G T A C G A G A A C C T G C C G T G G C C C S A C C G C C T C A T G A G C C T G G T G T C G G G C T T C G T C G A A G G C A A G G A C G A G C A A G G C C G G C T G C T G C G G C G C A C G C T C A T C C G C T A C G C C A A C C T G G G C A A C G T G C T C A T C C T G C G C A G C G T C A G C A C C G C A G T C T A C A A G C G C T T C C C C A G C G C C C A G C A C C T G G T G C A A G C A G g t g g g c g g a c c g g g a g c a a c g g g g a g g c a c c g g g c a g a g c c a g g g g c c g a g a t g g g c g c g g c a g g a a t g g a t c c </pre>
c.274C>A (Best)	
c.299T>G (Best)	
c.302C>G (Best)	
c.304T>C (Best)	
c.310G>C (Best)	
c.313C>G (Best)	

Tabelle 14: Mutationen in Exon 4 des VMD2-Gens

In der linken Spalte sind die Mutationen aufgelistet, in Klammern die Erkrankung des betreffenden Patienten. Die rechte Spalte zeigt die Sequenz, die in den Vektor kloniert wurde.

Die von der ADVIRC-Mutation betroffene Base ist gelb hinterlegt, diejenigen der Best-Mutationen rot.

Zur weiteren Beschreibung siehe Legende der Tabelle in Abschnitt 4.1.

Phänotyp	Mutation	Aminosäureposition
ADVIRC	c.256G>A	86
Best	c.274C>A	92
Best	c.299T>G	100

Best	c.302C>G	101
Best	c.304T>C	102
Best	c.310G>C	104
Best	c.313C>G	105

Tabelle 15: VMD2-Mutationen und Aminosäurepositionen

Aufgeführt ist die Position der Codons beziehungsweise Aminosäuren im Protein, das VMD2 kodiert, die jeweils von zugehöriger Mutation betroffen ist.

Quelle: VMD2-Datenbank der Universität Regensburg (http://www-huge.uni-regensburg.de/VMD2_database/).

4.2.1 VMD2 Exon 4 Spleißvarianten

Zur Auswertung dieses Teils der Arbeit war es wichtig, die qualitativen und quantitativen Unterschiede beim Spleißen exakt zu erfassen. Zu diesem Zweck wurde jedes pSPL3B-Konstrukt einer Mutation dreimal transfiziert, um einen Mittelwert zu erhalten. Die Intensität der auf dem Gel abgebildeten Banden soll dabei halb-quantitativ die Menge an PCR-Produkt widerspiegeln, die jeweils hergestellt, beziehungsweise auf das Gel aufgetragen worden ist. Mittels Phoretix TotalLab (siehe 2.9) kann die Intensität der einzelnen Banden als *Volume* gemessen werden.

Bei allen Mutationen und beim Wildtyp können zwei Spleißvarianten beobachtet werden (siehe Abbildung 11). Da auch die wt-cDNA eine kurze Variante ohne Exon 4 aufweist, scheint es sich um eine schwache Spleißstelle zu handeln. *Splice site prediction* von BDGP errechnet einen Wert von 0,92 für die *donor splice site* und 0,77 für die *acceptor splice site*, und kann damit dieses Phänomen nicht erklären.

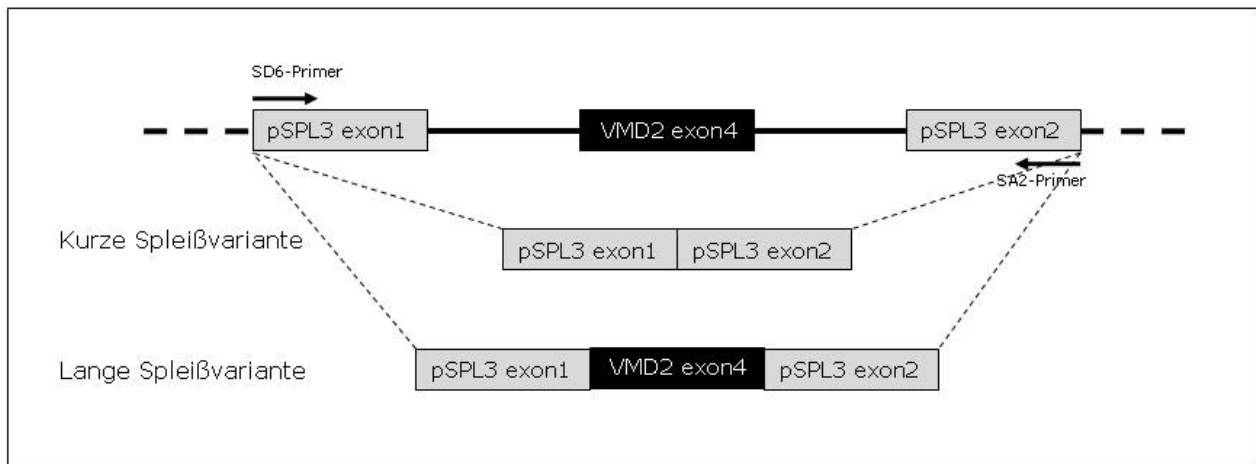


Abb. 11: Spleißvarianten VMD2 Exon 4

Die kurze Spleißvariante enthält Exon 1 und 2 des Vektors, die lange Variante zusätzlich Exon 4 des VMD2-Gens.

Abbildung 12 zeigt, wie und in welchem Ausmaß die Wildtyp-DNA und jeweils die DNA mit Mutation gespleißt worden ist.

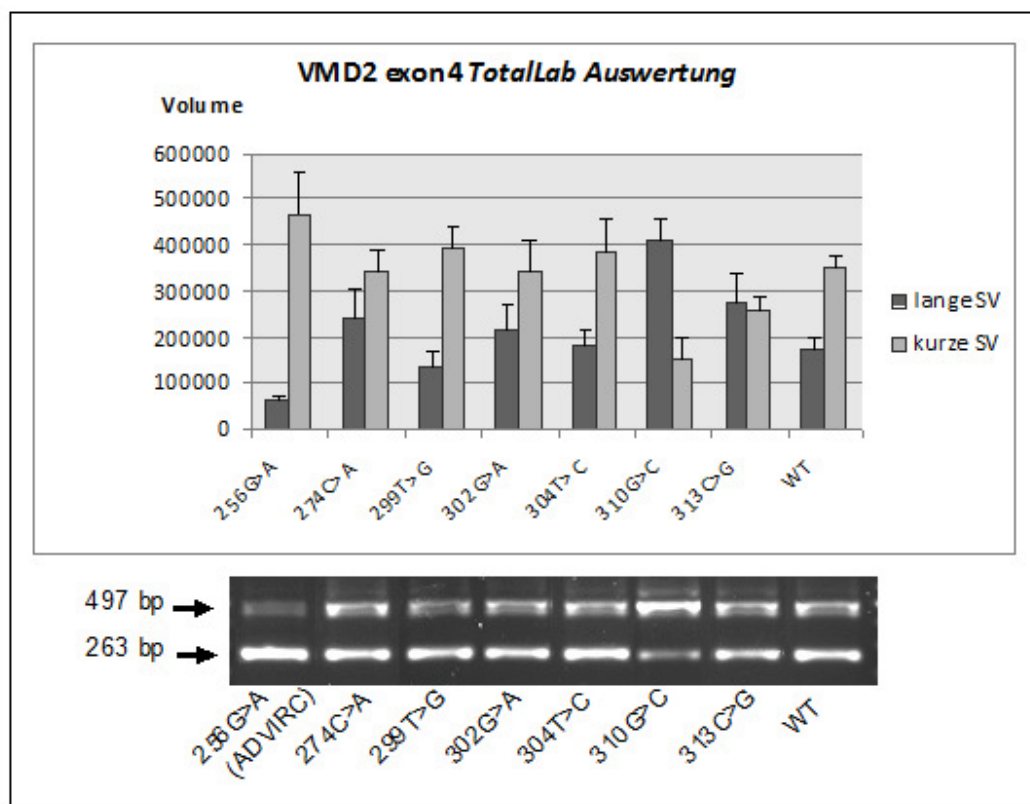


Abb. 12: cDNA VMD2 Exon 4

TotalLab Auswertung und Abbildung der cDNA (Doppelbanden der langen Spleißvariante: Heteroduplices). SV: Spleißvariante

Da die anfängliche Fragestellung lautete, ob Mutationen, die mit ADVIRC einhergehen, im Gegensatz zu Best-Mutationen *splice*-Mutationen sind, muss das Spleißverhalten der Mutationen im Vergleich zum Wildtyp betrachtet werden. Es fällt auf, dass die Verteilung der beiden Spleißvarianten aller Best-Mutationen ähnlich ausfällt wie bei der wt-cDNA. Eine Ausnahme stellt c.310C>G dar, da hier die lange Variante, die Exon 4 enthält, stärker vertreten ist. Im Vergleich von wt-cDNA und ADVIRC-Mutation wurde ein geringerer Anteil der mRNA mit Mutation korrekt gespleißt, das heißt es wurde Exon 4 öfter übersprungen als bei der wt-mRNA. Daraus resultiert die schwache Bande cDNA mit der langen Spleißvariante. Statistisch gesehen ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) vom Wildtyp für die ADVIRC-Mutation ($p = 0,03255$) und zwei Best-Mutationen (c.310G>C: $p = 0,045$ und c.313C>G: $p = 0,028$).

Ob daraus geschlossen werden kann, dass es sich bei ADVIRC-Mutationen ausschließlich um *splice*-Mutationen, bei Best-Mutationen hingegen um *missense*-Mutationen handelt, ist alleine aus diesen Ergebnissen nicht zu eruieren. Um eine Aussage treffen zu können, wären zudem weitere Daten hilfreich, wie zum Beispiel das Spleißverhalten von anderen ADVIRC-Mutationen und auch von Best-Mutationen, die in nächster Nähe zu diesen liegen.

4.2.2 Veränderungen in *exonic splice enhancer*-Sequenzen

Wie schon in der Einleitung erwähnt, sind für das Spleißosom unter anderem ESE wichtig, damit Exon-Intron-Grenzen erkannt werden können. Es gibt verschiedene SR-Proteine, die an diese Sequenzen binden, unter anderem SF2/ASF (*splicing factor 2/alternative splicing*), SC35, SRp40 und SRp55 (Graveley, 2000). Mit Hilfe eines Programms (ESEfinder 2.0, siehe 2.9) können *exonic splice enhancer* eines DNA-Anschnittes und dazugehörige SR-Proteine aufgefunden werden. Für diese Arbeit wurde dies mit Exon 4 des VMD2-Gens durchgeführt, und zwar für den Wildtyp und jeweils für die Mutationen. Beispielhaft ist in Abbildung 13 eine solche Analyse für die Wildtyp-Sequenz abgebildet. Die Abweichungen der mutierten DNA-Sequenz vom Wildtyp sind in Tabelle 14 festgehalten.

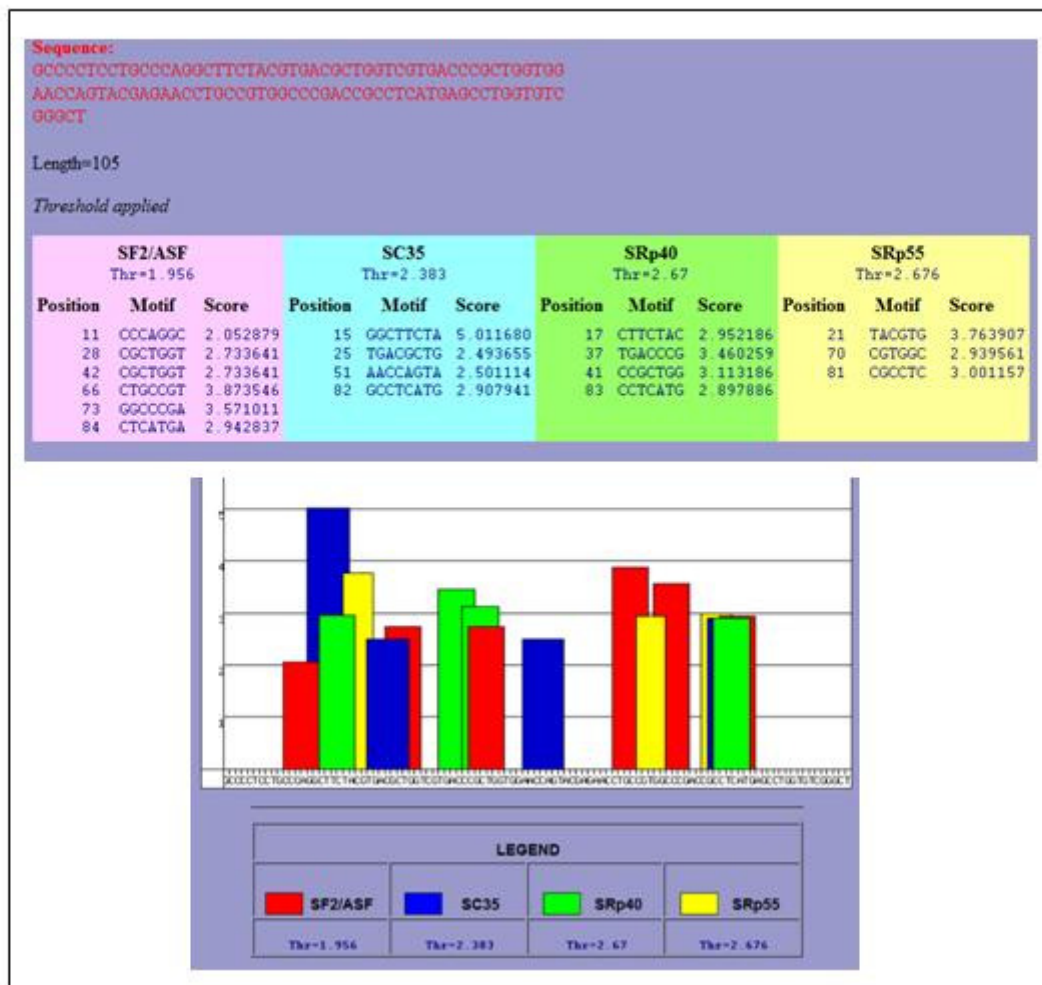


Abb. 13: ESEfinder-Analyse

Rot abgebildet ist die analysierte Sequenz, die in diesem Fall der Wildtyp-Sequenz von Exon 4 des VMD2-Gens entspricht. Die Tabelle zeigt Position, Basensequenz und Wert der ESE, denen jeweils die SR-Proteine zugeordnet werden (siehe auch 3.5.3), darunter die graphische Darstellung.

Quelle: <http://rulai.cshl.edu/tools/ESE2/>

Phänotyp	Mutationen	ESEfinder-Ergebnisse
ADVIRC	c.256G>A	Neue Sequenz für SRp40, Sequenz für SRp55 abgeschwächt
Best	c.274C>A	Sequenz für SF2/ASF und SRp40 geht verloren, neue Sequenz für SF2/ASF und SC35, Sequenz für SRp50 abgeschwächt
Best	c.299T>G	Sequenz für SF2/ASF verstärkt

Best	c.302C>G	Sequenz für SRp55 geht verloren, neue Sequenz für SRp55, Sequenz für SF2/ASF abgeschwächt
Best	c.304T>C	Neue Sequenz für SRp55, Sequenz für SF2/ASF abgeschwächt
Best	c.310G>C	Sequenz für SF2/ASF geht verloren, neue Sequenz für SC35 und SRp40
Best	c.313C>G	Sequenz für SRp55 geht verloren, neue Sequenz für SF2/ASF und SC35

Tabelle 16: ESEfinder-Ergebnisse

Aufgeführt sind nur die Ergebnisse, die von denen des Wildtyps abweichen.

Auf der Suche nach Hinweisen, ob die Beeinflussung von ESE durch Mutationen auch das Spleißverhalten verändert, kann aus diesen Daten keine neue Erkenntnis gewonnen werden. Es ergeben sich sowohl Veränderungen bei der ADVIRC-Mutation als auch bei allen Best-Mutationen, die kein bestimmtes Muster aufweisen, um daraus Schlüsse auf das Spleißverhalten ziehen zu können.

5. Diskussion

5.1 ABCA4-Mutationen

5.1.1 Analyse der ABCA4-Mutationen von Morbus Stargardt-Patienten

Bei Morbus Stargardt handelt es sich um eine autosomal-rezessive Erkrankung (Noble et al., 1979), das heißt Betroffene tragen auf beiden Allelen des verantwortlichen Gens eine pathogene Mutation. Die Interpretation von Mutationen, die mit der Erkrankung assoziiert sind, gestaltet sich jedoch oft schwierig, vor allem wenn keine Untersuchungen existieren, die den phänotypischen Effekt von Sequenzvariationen ermitteln können (Cotton and Scriver, 1998). In einer Studie von Rivera et al. (2000), die pathogene Mutationen im ABCA4-Gen beschreibt, wurden solche Mutationen als krankheitsrelevant eingestuft, die wahrscheinlich das Genprodukt verkürzen, das heißt *nonsense*-Mutationen, Insertionen und Deletionen mit Leserasterverschiebung und *splice site*-Mutationen sowie *missense*-Mutationen, die zu einem nicht-konservativen Aminosäureaustausch führen. Nukleotidvariationen, die öfter auftreten und in über 1% der Kontrollallele zu finden sind, werden hingegen als klassische Polymorphismen eingestuft (Rivera et al., 2000).

Die ABCA4-Mutationen, die für diese Arbeit untersucht wurden, stammen von Patienten mit Morbus Stargardt. Es sollte untersucht werden, ob sie als *splice site*-Mutationen mitverantwortlich für diese Erkrankung sind. Keiner der untersuchten Betroffenen ist für die analysierte Mutation homozygot. Folglich muss noch mindestens eine weitere Mutation auf dem zweiten Allel vorliegen, die krankheitsrelevant ist (*compound*-Heterozygotie). Die meisten Morbus Stargardt-Patienten, die in der Studie von Rivera et al. (2000) aufgeführt sind und bei denen Mutationen auf beiden Allelen nachgewiesen werden konnten, sind ebenfalls *compound* heterozygot. Die Mehrzahl trägt zwei *missense*-Mutationen oder eine *missense*-Mutation in Kombination mit einer, die zu einem verkürzten Protein führt. Es sind auch *splice site*-Mutationen in Kombination mit *nonsense*-Mutationen bekannt.

Eine bereits in der Literatur beschriebene Mutation (IVS40+5G>A, Rivera et al., 2000) diente für diese Arbeit als Positivkontrolle. Es konnte gezeigt werden, dass ein

Teil der Transkripte korrekt gespleißt, bei einem weiteren Teil hingegen Exon 40 übersprungen wurde. Dies sollte zu einer Restaktivität des ABCA4-Transporterproteins führen (Rivera et al., 2000). Eine weitere, pathogene Mutation konnte bei dem untersuchten Betroffenen bisher nicht gefunden werden, was vermutlich daran liegt, dass die Untersuchungsmethode nicht alle krankheitsassoziierten Mutationen aufdecken kann.

Die Negativkontrolle (IVS25+9G>C) zeigt wie erwartet keinen Effekt auf das Spleißen. Es könnte sich deshalb um eine Sequenzvariation ohne negative Auswirkung auf das Genprodukt handeln. Die Mutation wurde bei einem Patienten entdeckt, bei dem bereits eine pathogene Mutation im Exon 42 bekannt war (c.5882G>A). Diese sollte zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zur Glutaminsäure (p.Gly1961Glu) führen und gehört zu den drei häufigsten Mutationen bei Patienten mit Morbus Stargardt in der deutschen Bevölkerung (Rivera et al., 2000). Auch in diesem Fall ist demnach keine zweite pathogene Mutation bekannt.

Bei drei Patienten war schon im Vorfeld eine pathogene Mutation bekannt. Jeweils eine weitere konnte als *splice site*-Mutation identifiziert werden. IVS8+3A>C führt zur Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle und zu *Exon-skipping*. Es entstehen zwei Transkripte, die sich beide vom Transkript des Wildtyps unterscheiden. Eines davon zeichnet sich durch den Verlust von Exon 8 aus, das andere enthält ein verkürztes Exon 8, da ein Teil der Basenpaare der RNA verloren geht. Bei dem betreffenden Patienten ist mit einer Mutation im Exon 17 (c.2588G>C), die zu den acht häufigsten in der europäischen Bevölkerung zählt (Rivera et al., 2000), eine zweite bekannt. Es ist anzunehmen, dass die Kombination aus dieser *missense*-Mutation, die einen Aminosäureaustausch von Glycin nach Alanin (p.Gly863Ala) bedingt, und der *splice site*-Mutation zur Ausprägung von Morbus Stargardt führt. Ähnlich verhält es sich bei dem Patienten mit der Mutation IVS10+1G>T: es handelt sich um eine *splice site*-Mutation, während die zweite Mutation im Exon 42 (c.5882G>A) einen Aminosäureaustausch bedingen sollte (p.Gly1961Glu). Auch der Patient, der die Mutation c.6147G>A auf einem Allel trägt, hat zusätzlich eine heterozygote im Exon 21 (c.3113C>T), die zu einem Austausch von Alanin zu Valin im Codon 1038 führen sollte (p.Ala1038Val) und auch bei anderen Morbus Stargardt-Patienten bekannt ist (Rivera et al., 2000). Die Mutation c.6147G>A bewirkt, dass kein Transkript mit Exon 44 mehr entsteht, womit auch eine Restaktivität des ABCA4-Transporters unwahrscheinlich ist.

Bei der Mutation IVS2-1G>A handelt es sich nicht um eine *splice site*-Mutation. Sie führt zur Deletion einer Base in der RNA (r.161delG) und dürfte dadurch zum Kettenabbruch führen (p.Cys54SerfsX24) und somit keine Aktivität des Transportes mehr gewährleisten. Der Patient, der diese Veränderung trägt, weist ebenfalls eine zweite pathogene Mutation auf (c.5882G>A), deren Folge ein Aminosäureaustausch sein sollte (p.Gly1961Glu).

Die ebenfalls mittels *Exon-trapping* untersuchte Mutation im Exon 9 des ABCA4-Gens IVS9-5G>A weist auf die Grenzen des *in vitro Exon-trapping*-Assays hin, da selbst das Wildtyp-Transkript zum großen Teil Exon 9 nicht enthält. Nur bei einem sehr geringen Anteil wird das Wildtyp-Exon 9 mitgespleißt. Dies könnte an den *in vitro*-Bedingungen des Experimentes liegen, die die natürlichen Verhältnisse nur bedingt abbilden können. Laut der hier erzielten Ergebnisse müsste die Mutation auch zu einem verbesserten Spleißen führen und wäre somit nicht als pathogene Mutation einzustufen. Da auch die bioinformatischen Daten dieses Ergebnis nicht unterstützen, bleibt die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Mutation fraglich. Bei dem Patienten mit dieser Mutation ist eine weitere bekannt, die auch bei anderen Patienten mit Morbus Stargardt beschrieben wurde (<http://uwcmml1s.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/370748.html>) und als pathogen eingestuft wird. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch eine weitere pathogene Mutation beim Patienten vorliegt, die in Kombination mit letzterer zu der Krankheit führt.

Bei den sieben Patienten, deren Mutationen im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden, konnte gezeigt werden, dass drei *compound* heterozygot für eine *missense*- und eine *splice site*-Mutation sind. Einer der sieben trägt eine *missense*- in Kombination mit einer Mutation, die zu einem verkürzten Protein führen sollte. Die *splice-site* Mutation, die als Positivkontrolle diente, ist die einzige nachgewiesene des Betroffenen, während der Patient, dessen Mutation als Negativkontrolle verwendet wurde, als einzige bekannte pathogene eine *missense*-Mutation trägt. Auch bei dem Patienten, dessen analysierte Mutation zu verbessertem Spleißen führt und somit hier nicht als pathogen eingestuft werden kann, trägt eine *missense*-Mutation.

5.1.2 Klinische Ausprägung von Morbus Stargardt

Da verschiedene Mutationen im ABCA4-Gen unterschiedliche Phänotypen hervorrufen, muss eine enge Genotyp-Phänotyp-Korrelation bestehen. Eine Theorie dazu ist, dass die Restaktivität des ABCA4-Transporters invers mit der Ausprägung der Retinadystrophie korreliert. So soll Morbus Stargardt mit einer schweren und einer milden Mutation assoziiert sein, die eine Restaktivität des Transporters ermöglichen (Maugeri et al., 2000). Es bestehen auch interindividuelle Unterschiede in der Krankheitsausprägung. Mit Hilfe von ophthalmologischen Gutachten kann die klinische Ausprägung von Morbus Stargardt einiger Patienten, deren DNA für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurde, festgehalten und diskutiert werden. Aufgrund der Unverfügbarkeit und Unvollständigkeit einiger Gutachten ist dies nicht für alle Patienten möglich.

Bei der Mutation IVS2-1G>A handelt es sich um eine *out of frame*-Mutation, die zu einem verkürzten Genprodukt führen sollte. Der betreffende Patient trägt außerdem eine *missense*-Mutation auf einem Allel. Der Patient stellte sich erst mit 36 Jahren zur Abklärung einer Netzhauterkrankung vor, nachdem er eine progrediente Sehverschlechterung am linken Auge seit circa sechs Monaten bemerkt hatte. Damit handelt es sich um einen späten Beginn der Erkrankung, die üblicherweise im ersten oder zweiten Lebensjahrzehnt manifest wird (Briggs, 2001). Außerdem beklagte der Patient Nachtsehstörungen und Blendempfindlichkeit seit mehreren Jahren. Auch geringe Farbsinnesstörungen, wie sie typisch für Morbus Stargardt sind (Kellner et al., 2004), wurden bemerkt. Das Gesichtsfeld wurde subjektiv als uneingeschränkt, jedoch zentral etwas „nebelig“ beschrieben. Die Untersuchungsbefunde ergaben zu diesem Zeitpunkt einen Visus von 0,7 am rechten Auge und von 0,2 am linken Auge. Der Fundus imponierte mit normaler Peripherie, normalen Gefäßen und randscharfer Papille beidseits, jedoch mit Pigmentverschiebungen im Makulabereich ebenfalls beidseits und *bull's eye*-ähnlichen Veränderungen links. Im Amsler Gitter erschienen alle Linien gerade, jedoch an beiden Augen zentral „nebelig“. Die Perimetrie ergab ein Zentralskotom beidseits. Im Ganzfeld-ERG waren alle Antworten im Normbereich, im Multifokal-ERG hingegen zeigten sich deutlich erniedrigte Antworten mit Latenzverlängerung in zentralen drei Ringen, wie für Morbus Stargardt zu erwarten ist. Zehn Monate nach Erhebung dieser Befunde wurde eine Visusreduktion von 0,7 auf 0,1 am rechten Auge festgestellt, der Visus am linken Auge blieb stabil, ebenso wie die elektrophysiologischen Untersuchungsergebnisse. Die Mutationen,

die bei diesem Patienten bekannt sind, führen demnach zu einem späten Krankheitsbeginn, jedoch zu einer raschen Visusreduktion.

Das Alter des Patienten mit Mutation c.6147G>A im Exon 44 bei Krankheitsbeginn ist nicht bekannt, jedoch bestanden bereits mit 28 Jahren erhebliche Visuseinschränkungen mit Zentralskotom und Blendempfindlichkeit. Im ersten vorliegenden Untersuchungsbefund fiel beidseits ein hinterer Polstar auf, zwei Jahre später eine geringe Cataract mit kugeliger Kerntrübung, wobei der reduzierte Visus nicht darauf, sondern auf die Netzhautveränderungen zurückgeführt wurde. Der Fundus imponierte mit unauffälliger Peripherie, etwas verengten Gefäßen und Makulaveränderungen beidseits. Die Perimetrie ergab auf beiden Augen relative und absolute Ausfälle im zentralen 15° Bereich und eine leichte Zunahme der diffusen Ausfälle im 30° Bereich innerhalb von zwei Jahren, das heißt es liegt ein Zentralskotom beidseits vor. Das Multifokal-ERG zeigte erwartungsgemäß in drei zentralen Ringen erniedrigte Amplituden. Der Visus wurde auf beiden Augen mit 1/50, zwei Jahre später mit 1/35 angegeben, zeigte also über diesen Zeitraum keine Progredienz. Die Ergebnisse der *Exon-trapping*-Assays ergaben, dass die Mutation c.6147G>A zu komplettem *Exon-skipping* führt. Es sollte sich also um eine schwerwiegende Mutation handeln, die vereinbar mit den Symptomen, unter anderem der starken Visusreduktion, des Patienten ist.

Bei dem Patienten, dessen Mutation IVS9-5G>A im *in-vitro Exon-trapping* verbessertes Spleißen der DNA zeigte, wurde vor Abklärung eines Morbus Stargardt im Alter von 31 Jahren eine idiopathische Choroidopathia haemorrhagica centralis diagnostiziert. Außerdem wurden zentrale Narben auf eine stattgehabte Chorioretinitis beidseits zurückgeführt. Es zeigten sich subretinale Neovaskularisationen, die für Morbus Stargardt untypisch sind. Der Visus betrug zu dieser Zeit am rechten Auge 0,2 und am linken Auge 1,0. Unter Steroid-Therapie verbesserte sich der Visus des rechten Auges auf 0,3 bis 0,4, verschlechterte sich jedoch auf beiden Augen im Lauf der nächsten Jahre kontinuierlich (RA 1/25, LA 0,125). Erst fünf Jahre später wurde die Stargardt'sche Erkrankung mittels humangenetischer Diagnostik, die die *missense*-Mutation c.6079C>T aufdeckte, festgestellt, nachdem die Verdachtsdiagnose Fundus flavimaculatus geäußert worden war. Die *Exon-trapping*-Analyse der zweiten Mutation (IVS9-5G>A) konnte nicht abschließend klären, ob es sich dabei um eine pathogene Mutation handelt, da sie unerklärlicherweise zu verbessertem Spleißen führt.

Bei dem Träger der Mutation IVS40+5G>A ist lediglich der Krankheitsbeginn von 10 Jahren bekannt. Er zeigt somit den charakteristischen frühen Beginn der juvenilen Makuladystrophie. Diese Mutation führt im *Exon-trapping*-Experiment zu zwei Transkripten, wobei nur eines Exon 10 enthält. Da bei diesem Patienten keine zweite pathogene Mutation bekannt ist, kann nicht beurteilt werden, ob sich der frühe Beginn der Erkrankung durch die Schwere der beiden Mutationen erklärt.

5.2 VMD2-Mutationen

5.2.1 VMD2-Mutationen und Ansätze zur Klärung der Krankheitsentstehung

Bis heute kennt man über 100 Mutationen im VMD2-Gen, die mit Morbus Best oder ADVIRC einhergehen. Bei den Morbus Best-Mutationen handelt es sich in über 93% der Fälle um Punktmutationen, die zu einem Aminosäureaustausch im Protein führen (sogenannte *missense*-Mutationen). Es ist jedoch auch eine Mutation im Bereich einer hochkonservierten Donor-Spleißsequenz bekannt, die zu fehlerhaftem Spleißen führt (Krämer et al., 2000). Betrachtet man die Verteilung der Mutationen über das Bestrophin-Protein, fällt auf, dass sich ein wesentlicher Teil davon auf vier Regionen in der N-terminalen Hälfte des Bestrophin zwischen Aminosäure 6 und 311 konzentriert. Diese sogenannten *Hotspot*-Bereiche befinden sich zwischen den Aminosäuren 6 bis 30, 73 bis 104, 218 bis 243 und 293 bis 311 (Stöhr et al., 2005). Die Mutationen, die für diese Arbeit untersucht wurden, befinden sich alle im zweiten *Hotspot* zwischen Codon 73 und 104 (siehe Tabelle 15).

Nicht nur die *Hotspot*-Regionen sollten im Bezug auf die Verteilung der Mutationen betrachtet werden, sondern auch die Transmembrandomänen. In Punkt 1.4 wurde bereits auf das Modell der Integration von Bestrophin in die Membran hingewiesen. Geht man vom Modell nach Milenkovic et al. (2007) aus, betrifft die ADVIRC Mutation Transmembrandomäne 2, die tatsächlich in die Membran integriert ist. Diese Domäne umfasst die Aminosäuren 68 bis 90. Die Aminosäuren hingegen, die durch Best-Mutationen von einem Austausch betroffen sind, sind diesem Modell zufolge Teil der hydrophoben Schleife, die ins Zytoplasma ragt. Vergleicht man dagegen die Lage der Aminosäuren im Modell von Tsunenari et al. (2003), würden zwei weitere Mutationen Teil der Transmembrandomäne sein, nämlich diese an Position 92 und 100. Es sind außerdem weitere ADVIRC-Mutationen bekannt, deren betreffende Aminosäuren Teil der Transmembrandomäne 5 sind, die ebenfalls in die Membran integriert ist (c.704T>C, c.707A>G und c.715G>A; VMD2-Datenbank der Universität Regensburg). Nimmt man also an, dass das Modell des Aufbaus und der Integration von Bestrophin von Milenkovic et al. der Wirklichkeit entspricht, könnte dies ein weiterer Ansatz zur Aufklärung des Mechanismus, wie Mutationen im VMD2-Gen

entweder zu ADVIRC oder Morbus Best führt, sein. Es bleibt also zu klären, ob die ADVIRC-Mutationen zufällig in Transmembrandomänen fallen, während sich die meisten Best-Mutationen außerhalb dieser befinden (Burgess et al. 2008(2), siehe Abbildung 13), und ob sich dadurch ein weiterer Hinweis auf die Krankheitsentstehung findet.

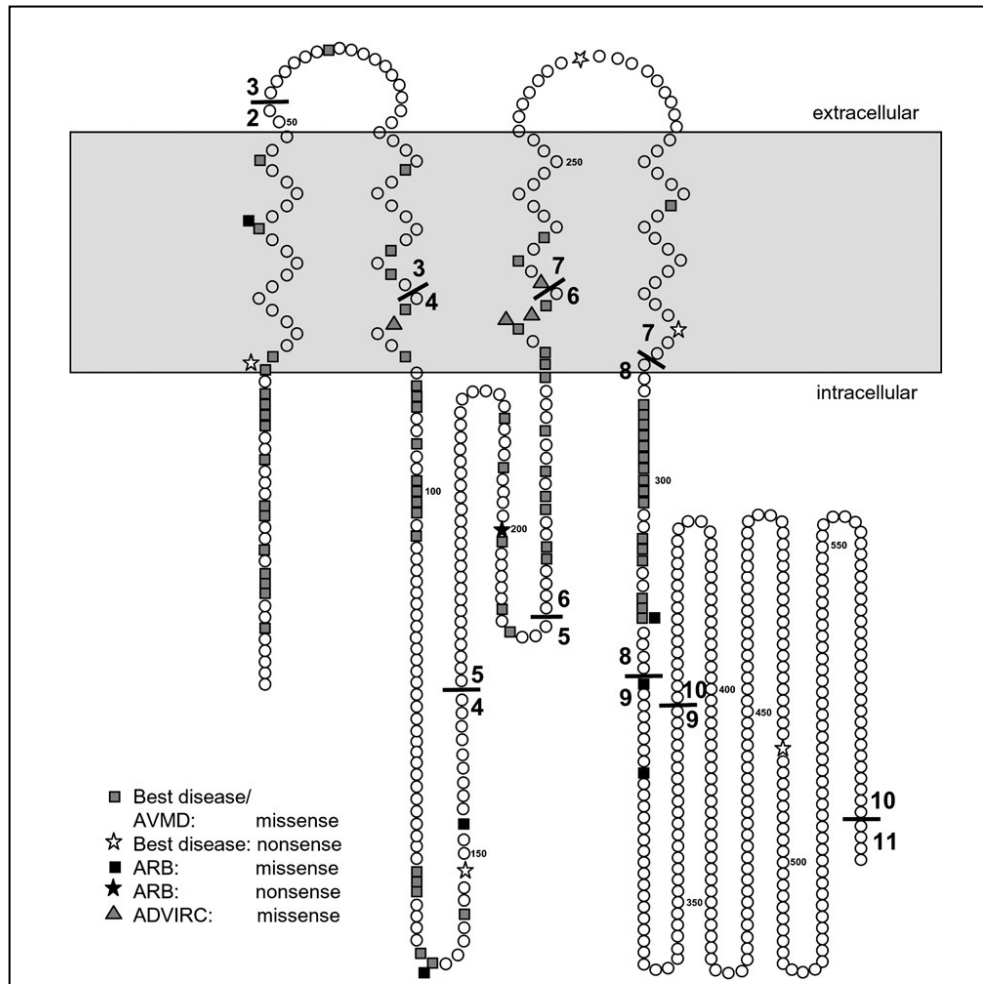


Abb. 14: Schema von Bestrophin-1

Gezeigt sind bekannte Mutationen, die assoziiert sind mit Morbus Best, ADVIRC, adulter vitelliformer Makuladystrophie (AVMD) und autosomal-rezessiver Bestrophinopathie (ARB)

Quelle: Burgess et al. 2008(2)

Klassischerweise wird eine Punktmutation als *missense*-Mutation bezeichnet, wenn als Resultat ein Aminosäureaustausch vermutet wird. Ohne experimentelle Untermauerung lässt sich aber nicht feststellen, ob wirklich nur eine Aminosäure ausgetauscht wird, oder ob der Austausch weiter reichende Folgen hat, wie zum Beispiel die Unterbindung der korrekten Prozessierung der mRNA. Es wird sogar vermutet, dass 15 % aller Punktmutationen durch Zerstörung von Spleißsignalen zu Veränderungen im Spleißvorgang führen. Diese Spleißsignale können cis-Elemente

sein. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Zerstörung einer ESE-Sequenz für SF2/ASF durch einen einzigen Nukleotidaustausch in einem Exon des SMN2-Gens (*survival of motor neuron 2*) zum Überspringen dieses Exons führt. In der Folge entsteht ein Protein ohne die Aminosäuren dieses Exons (Cartegni et al, 2002).

Dies ist ein weiterer Ansatz, der erklären könnte, warum benachbarte Mutationen im VMD2-Gen entweder zu ADVIRC oder zu Morbus Best führen. Gegenstand dieser Arbeit war dementsprechend auch, das Spleißverhalten dieser Variationen zu untersuchen. Es gibt verschiedene Erklärungsansätze, wie es zu den beiden klinisch sehr unterschiedlichen Erkrankungen kommt.

Man nimmt an, dass Morbus Best in den meisten Fällen nicht durch fehlerhaftes Spleißen entsteht. Die Punktmutation scheint die physiologische Funktion von Bestrophin durch einen Aminosäureaustausch zu beeinflussen. Dass ein dominantes Vererbungsmuster vorliegt, könnte sich durch Haploinsuffizienz erklären lassen, was bedeutet, dass im Vergleich zum Gesunden zu wenig funktionsfähiges Membranprotein produziert wird (Stöhr et al., 2005). Ein anderes Modell erklärt das Vererbungsmuster durch einen dominant negativen Effekt, wobei mutiertes Bestrophin zum Beispiel die Leitfähigkeit von Chloridionen des eigentlich intakten Proteins durch Oligomerisierung von funktionsfähigen und mutanten Untereinheiten inhibiert (Sun, 2002).

Yardley et al. (2004) sehen als Ursache für ADVIRC *Exon-skipping*, wodurch heterozygote Betroffene drei Isoformen von Bestrophin produzieren, darunter intaktes Bestrophin des Wildtyp-Allels und zwei veränderte Proteinformen des mutierten Allels. Eine dieser Formen zeichnet sich aus durch einen Aminosäureaustausch aufgrund des veränderten Nukleotids, die andere durch eine *in frame*-Deletion, das heißt es gehen zwar Aminosäuren verloren, das Leseraster wird aber nicht verschoben.

Auf dem Hintergrund dieser Überlegungen liegt dem Pathomechanismus von Mutationen im VMD2-Gen eine hohe Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu Grunde (Yardley et al., 2004), das bedeutet, die Mutationen sind mit bestimmten Krankheitsbildern eng verbunden. Diese Betrachtungen auf molekulargenetischer Ebene lassen aber noch keine endgültigen Rückschlüsse auf den eigentlichen Pathomechanismus von Morbus Best und ADVIRC zu. So ist bei Morbus Best die Makula betroffen, während bei ADVIRC die Augenentwicklung gestört ist und die

Peripherie der Retina Veränderungen aufweist. Im Vergleich besteht also eine Diskrepanz zwischen dem Zeitpunkt des Auftretens beider Erkrankungen und den betroffenen Arealen.

Das Ergebnis der Experimente zu VMD2-Mutationen im Rahmen dieser Arbeit ergibt, dass bedingt durch die ADVIRC-Mutation signifikant weniger von Exon 4 des VMD2-Gens gespleißt wird als dies beim Wildtyp der Fall ist. Dies entspricht auch der These von Yardley et al. (2004), ADVIRC sei Folge von *Exon-skipping* auf molekularer Ebene. Abschließend beweisen lässt sich dies jedoch nicht. Um die These zu untermauern wären weitere Daten hilfreich, wie das Spleißverhalten anderer ADVIRC-Mutationen. Zudem könnte die Untersuchung von Best-Mutationen, die in nächster Nähe zu ADVIRC-Mutationen liegen, weitere Erkenntnisse bringen. Es bleibt auch die Frage offen, weshalb sich zwei Best-Mutationen (c.310G>C und c.313C>G) in ihrem Spleißverhalten signifikant von der des Wildtyps unterscheiden, und die cDNA dieser Mutationen quantitativ mehr an Exon 4 enthält.

5.2.2 Auswirkung von VMD2-Mutationen auf *exonic splice enhancer*

Yardley et al. (2004) stellen die Hypothese auf, dass ADVIRC- im Gegensatz zu Morbus Best-Mutationen durch die Veränderung von ESE-Sequenzen den Spleißprozess beeinträchtigen. Es werden Daten gezeigt, die mit Hilfe von ESEfinder eruiert wurden. So wird für eine Best-Mutation (c.253T>C) kein Hinweis auf eine Veränderung gefunden, während zwei ADVIRC-Mutationen neue Sequenzen für SR-Proteine entstehen lassen (SRp40 für c.256G>A und SC35 für c.707A>G). Eine weitere Best-Mutation (c.266T>C) verliert zwar eine Stelle für SF2/ASF, was aber ebenso bei einem neutralen Polymorphismus der Fall ist. Anhand dessen kommt man zu dem Schluss, dass ADVIRC-Mutationen möglicherweise *splicing*-Regulatoren verändern, und es sich darum tatsächlich um *splice site*-Mutationen handelt. Vergleicht man allerdings die Ergebnisse von Yardley et al. (2004) mit denen in Tabelle 16, erkennt man, dass bei Auswertung von mehreren Mutationen kein klarer Zusammenhang zwischen verloren gegangenen oder neuen ESE-Sequenzen und dem vermuteten Spleißverhalten besteht. So weist zum Beispiel auch eine Best-Mutation (c.310G>C) neue Bindestellen für SRp40 und SC35 auf, eine weitere (c.313C>G) für SRp55. Außerdem wird in vielen Fällen die angenommene Bindekraft verändert, oder eine oder mehrere ESE-Sequenzen gehen verloren. Mit Hilfe von

ESEfinder kann also für das VMD2-Gen nicht verifiziert werden, dass die Veränderung von ESE über abgewandeltes Spleißen zu ADVIRC führt, während dies bei Morbus Best nicht der Fall sein soll. Außerdem sollte man nicht außer Acht lassen, dass neben ESE auch die ESS-Spleißregulatoren eine Rolle spielen, deren Funktion bei diesen Betrachtungen bisher vernachlässigt wurde.

Burgess et al. (2008) untersuchten die Auswirkungen von Mutationen, die ADVIRC oder Morbus Best auslösen, nicht nur theoretisch, sondern auch experimentell. So konnte gezeigt werden, dass benachbarte Nukleotidabweichungen unterschiedliche Bindungsaffinität für das SR-Protein ASF/SF2 zur Folge haben. So zeigt sich für die ADVIRC-Mutationen (c.704T>C und c.707A>G) eine verstärkte Affinität für dieses Protein im Vergleich zur Wildtyp- oder Best-RNA (c.703G>C), während die Affinität für SC35, SRp40 und SRp55 annähernd gleich bleibt. Mittels eines Minigen-Assays wurde zusätzlich gezeigt, dass die cDNA mit ADVIRC-Mutationen in einem geringeren Ausmaß das betreffende Exon enthält, als die Wildtyp- und Best-cDNA. Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass es sich bei dieser Sequenz, die die Mutationen beinhaltet, um einen Bestandteil von *composite exonic regulatory elements of splicing* (CERES) handelt. Diese Art von Spleißfaktor wurde für eine Sequenz im CFTR-Gen (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) in Exon 12 definiert, die erklären soll, wie benachbarte *missense*-Mutationen zu einer variablen Ausbeute von Transkripten durch *Exon-skipping* führen. Dieser Ansatz könnte zur Aufklärung der Variabilität des Phänotyps von Krankheitsbildern, deren Auslöser benachbarte Mutationen sind, beitragen (Pagani et al. 2003), wie es auch im VMD2-Gen der Fall ist. Diese Vermutung bleibt allerdings zu beweisen, ebenso, wie es sich bei der ADVIRC-Mutation c.256G>A verhält.

6. Zusammenfassung

Mutationen im ABCA4- und VMD2-Gen können verantwortlich sein für Erkrankungen wie Morbus Stargardt, Morbus Best oder ADVIRC. Generell können Mutationen durch unterschiedliche Pathomechanismen als *missense*-, *nonsense*-, *splice site*-Mutationen oder durch Deletionen sowie Insertionen eine Auswirkung auf das Genprodukt haben. Mit Hilfe einer funktionellen Untersuchung, dem *Exon-trapping*, kann *in vitro* überprüft werden, ob es sich bei einer Mutation um eine *splice site*-Mutation handelt. Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung von Mutationen in den Genen ABCA4 und VMD2 von Patienten mit Morbus Stargardt, Morbus Best oder ADVIRC in Hinblick auf ihre Auswirkung auf den Spleißvorgang.

In dem Projektbereich, der Mutationen im ABCA4-Gen umfasst, zeichnet sich ein heterogenes Bild ab, wie Mutationen, die *splice sites* betreffen, sich auf das Spleißen auswirken können. So kommt es in einem Fall zur Deletion einer Base und in der Folge zu einer *out of frame*-Mutation. In anderen Fällen führen Mutationen zu *Exon-skipping* und damit zum vollständigen oder teilweisen Verlust des betreffenden Exons, oder zur Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle innerhalb der untersuchten Sequenz. In den meisten Fällen ergab sich eine Übereinstimmung des *in vitro*-Ergebnisses mit dem Ergebnis von Programmen, die eine Vorhersage über die Wahrscheinlichkeit treffen, mit der *splice sites in vivo* als solche erkannt werden. Eine Ausnahme bildet eine Sequenz, in der die mutante cDNA im Vergleich zum Wildtyp durch verbessertes Spleißen auffällt. Es findet sich keine Übereinstimmung mit den bioinformatischen Daten und bietet somit auch keine Erklärung für dieses Phänomen, das aufgrund der *in vitro*-Verhältnisse der Experimente kritisch betrachtet werden muss.

Im Projektbereich um Mutationen im VMD2-Gen zeigte sich, dass die untersuchte Mutation, die zu ADVIRC führt, mit reduziertem prä-mRNA-*splicing* einher geht. Es scheint sich also um eine *splice site*-Mutation zu handeln. Die analysierten Best-Mutationen hatten keinen Einfluss auf das Spleißen oder führten zu verbessertem Spleißen. Insofern stimmen die Ergebnisse mit denen von Yardley et al. (2004) überein. Keine Übereinstimmung findet sich jedoch im Hinblick auf bioinformatische Daten, die mit Hilfe des Programms ESEfinder (siehe 3.5.3) erhoben wurden. Alle Mutationen führten entweder zu einem Verlust oder zu einer Abschwächung von ESE-Sequenzen sowie zu neuen ESE-Sequenzen. Diese Veränderungen lassen

jedoch kein Muster erkennen, das das Spleißverhalten vorhersagen könnte, wie von Yardley et al. (2004) proklamiert. Zusammenfassend beurteilt ergibt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit der Hinweis, dass ADVIRC-Mutationen zu reduziertem Spleißen des betreffenden Exons führen. Die untersuchten Best-Mutationen scheinen jedoch keine *splice site*-Mutationen zu sein. Zur weiteren Untermauerung dieser These sind jedoch weitere Daten nötig. Ein Zusammenhang zwischen Mutation und Veränderung von ESE-Sequenzen lässt sich durch die herangezogenen bioinformatischen Daten außerdem nicht erklären.

Literaturverzeichnis

Allikmets, R., Singh, N., Sun, H., Shroyer, N. F., Hutchinson, A., Chidambaram, A., Gerrard, B., Baird, L., Stauffer, D., Pfeiffer, A., Rattner, A., Smallwood, P., Li, Y., Anderson, K. L., Lewis, R. A., Nathans, J., Leppert, M., Dean, M. & Lupski, J. R., (1997) A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet*, 15:236-46

Berg, O.G. & von Hippel, P.H. (1987) Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. Statistical-mechanical theory and applications to operators and promoters. *J Mol Biol*, 193(4):723-50

Blacharski, P. A. (1988) Fundus flavimaculatus. In *Retinal Dystrophies and Degenerations* (ed Newsome, D. A.). *Raven Press, New York*, 135-59

Blair, N. P., Goldberg, M. F., Fishman, G. A. & Salzano T. (1984) Autosomal dominant vitreoretinopathopathy (ADVIRC). *British Journal of Ophthalmology*, 68:2-9

Boon, C. J. F., van Schoonefeld, M. J., den Hollander, A. I., van Lith-Verhoeven, J. J. C., Zonneveld-Vrieling, M. N., Theelen, T., Cremers, F. P. M., Hyong, C. B. & Klevering, B. J. (2007) Mutations in the peripherin/RDS gene are an important cause of multifocal pattern dystrophy simulating STGD1/fundus flavimaculatus. *Br J Ophthalmology*, 91:1504-11.

Briggs, C. E., Rucinski, D., Rosenfeld, P.J., Hirose, T., Berson, E. L., & Dryja, T. P. (2001) Mutations in ABCR (ABCA4) in patients with Stargardt Macular Degeneration or Cone-Rod Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42: 2229-36

Burgess, R., MacLaren, R., Davidson, A., Urquhart, J., Holder, G., Robson, A., Moore, A., O'Keefe, R., Black, G. & Manson, F. (2008) ADVIRC is caused by distinct mutations in BEST1 that alter pre-mRNA splicing. *J Med Genet*, published online, doi:10.1136/jmg.2008.059881

Burgess, R., Millar, I. D., Leroy, B. P., Urquhart, J. E., Fearon, I. M., De Baere, E., Brown, P. D., Robson, A. G., Wright, G. A., Kestelyn, P., Holder, G. E., Webster, A. R., Manson, F. D. C. & Black, G. C. M. (2008(2)) Biallelic mutation of BEST1 causes a distinct retinopathy in humans. *The American Journal of Human Genetics*, 82:19-31

Burn, T. C., Connors, T. D., Klinger, K., W. & Landes, G. M. (1995) Increased exon-trapping efficiency through modifications to the pSPL3-splicing vector. *Gene*, 161:183-87

Cartegni, L., Chew, S. L. & Krainer, A. R. (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics*, 3:285-98

Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M. Q. & Krainer, A. R. (2003) ESEfinder: a web resource to identify exonic splice enhancers. *Nucleic Acids Research*, 31(13):3568-71

Cideciyan, A. V., Aleman, T. S., Swider, M., Schwartz, S. B., Steinberg, J. D., Brucker, A. J., Maguire A. M., Bennett J., Stone E. M. & Jacobson S. G. (2003) Mutations in ABCA4 result in accumulation of lipofuscin before slowing of the retinoid cycle: a reappraisal of the human disease sequence. *Human Molecular Genetics*, 13:525-34

Cotton, R. G. H. & Scriver, C. R. (1998) Proof of “disease causing” mutation. *Hum Mutat*, 12:1-3

Cremers, F.P., van de Pol, D.J., van Driel, M., den Hollander, A.I., van Haren, F.J., Knoers, N.V., Tijmes, N., Bergen, A.A., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Pinckers, A.J., Deutman, A.F. & Hoyng, C.B. (1998) Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. *Hum Mol Genet*, 7:355–362

Dominik, A. & Steinhilber, D. (2002) Instrumentelle Analytik. *Deutscher Apotheker Verlag*, Stuttgart, 2. Auflage, 243-45

Gerber, S., Rozet, J.M., van de Pol, T. J. R., Hyong, C. B., Munnich, A., Blankenagel, A., Kaplan, J. & Cremers, F. P. M. (1998) Complete exon-intron structure of the retina-specific ATP binding transporter gene (ABCR) allows the identification of novel mutations underlying Stargardt disease. *Genomics*, 48:139-42

Faustino, A. N. & Cooper, T. A. (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev*, 17:419-37

Graveley, B. R. (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*, 6:1198-1211

Kaplan, J., Gerber, S., Larget-Piet, D., Rozet, J.M., Dollfus, H., Dufier, J.L., Odent, S., Postel-Vinay, A., Janin, N., Briard, M.L., Frezal, J. & Munnich A. (1993) A gene for Stargardt's disease (fundus flavimaculatus) maps to the short arm of chromosome 1. *Nature Genet*, 5:308-311

Kaufman, S. J., Goldberg, M. F., Orth, D. H., Fishman, G. A., Tessler, H. & Mizuno, K. (1982) Autosomal Dominant Vitreoretinchoroidopathy. *Arch Ophthalmol*, 100:272-78

Kellner, U., Renner, A. B. & Tillack, H. (2004) Hereditäre Netzhaut-Aderhaut-Dystrophien. *Ophthalmologe*, 101:397-414

Kellner, U. & Wachtlin, J. (2008) Retina – Diagnostik und Therapie der Erkrankungen des hinteren Augenabschnitts. *Georg Thieme Verlag KG*, Stuttgart, 64-66

Kobs, G. (1997) *Promega Notes Magazine*, 62:15

Marquardt, A., Stöhr, H., Passmore, L. A., Kramer, F., Rivera, A. & Weber, B. H. F. (1998) Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties

cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease). *Hum Mol Genet*, 7:1517-25

Maugeri, A., Klevering, B. J., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Brunner, H. G., Deutman, A. F., Hyong, C. B. & Cremers, F. P. M. (2000) Mutations in the ABCA4 (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Am J Human Genet*, 67:960-66

Milenkovic, V. M., Rivera, A., Horling, F. & Weber, B. H. F. (2007) Insertion and topology of normal and mutant bestrophin-1 in the endoplasmatic reticulum membrane. *J Biol Chem*, 282:1313-21

Molday, L. L., Rabin, A. R. & Molday R. S. (2000) ABCR expression in foveal cone photoreceptors and its role in Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet*, 25:257-58

Mülhardt, C. (2003) Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. *Elsevier GmbH*, München, 4. Auflage

Nasonkin I., Illing M., Koehler M. R., Schmid, M., Molday, R. S. & Weber, B. H. F. (1998) Mapping of the rod photoreceptor ABC transporter (ABCR) to 1p21-1p22.1 and the identification of novel mutations in Stargardt's disease. *Hum Genet.*, 102:21-26

Noble, K. G. & Carr, R. E. (1979) Stargardt's disease and Fundus flavimaculatus. *Arch Ophthalmol*, 97:1281-85

Pagani, F., Stuani, C., Tzetis, M., Kanavakis, E., Efthymiadou, A., Doudounakis, S., Casals, T. & Baralle, F. E. (2003) New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements in CFTR exon 12. *Human Molecular Genetics*, 12(10):1111-20

Penotti, F.E. (1991) Human pre-mRNA splicing signals. *J theor Biol*, 150:385-420

Reese, M. G., Eeckman, F. H., Kulp, D. & Haussler, D. (1997) Improved splice site detection in genie. *J Comp Biol*, 4(3):311-23

Rivera, A., White, K., Stöhr, H., Steiner, K., Hemmrich, N., Grimm, T., Jurklies, B., Lorenz, B., Scholl, H. P. N., Apfelstedt-Sylla, E. & Weber, B. H. F. (2000) A comprehensive survey of sequence variation in the ABCA4 (ABCR) gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet*, 67:800-13

Rosenthal, R., Bakall, B., Kinnick, T., Peachy, N., Wimmers, S., Wadelius, C., Marmorstein, A. & Strauss, O. (2005) Expression of bestrophin-1, the product of the VMD2 gene, modulates voltage-dependent Ca^{2+} channels in retinal pigment epithelial cells. *Faseb J*, 20:178-80

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, Cold Spring Laboratory Press*

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating-inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74:5463-67

Schneider, B., Koppius, A., Sedlmeier, R. (2007) Use of an exon-trapping vector for the evaluation of splice-site mutations. *Mamm Genome*, 18:670-76

Stöhr, H., Milenkovic, V. & Weber, B. H. F. (2005) VMD2 und seine Rolle bei Morbus Best und anderen Retinopathien. *Ophthalmologe*, 102:116-21

Stone, E. M., Nichols, B. E., Streb, L. M., Kimura, A. E. & Sheffield, V. C. (1992) Genetic linkage of vitelliform macular degeneration (Best's disease) to chromosome 11q13. *Nat Genet*, 1:246-50

Sun, H. & Nathans, J. (1997) Stargardt's ABCR is localized to the disc membrane of retinal rod outer segments. *Nat Genet*, 17:15-16

Sun, H., Tsunenari, T., Yau, K. W. & Nathans, J. (2002) The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:4008-13

Trepel, M. (2004) Neuroanatomie Struktur und Funktion. *Elsevier GmbH*, München, 4. Auflage

Tsunenari, T., Sun, H., Williams, J., Cahill, H., Smallwood, P., Yau, K. W. & Nathans, J. (2003) Structure and function of the bestrophin family of anion channels. *J. Biol. Chem*, 278:41114-25

Vincent, A., McAlister, C., VandenHoven, C. & Héon, E. (2011) Best1-related autosomal dominant vitreoretinopathopathy: a degenerative disease with a range of developmental ocular anomalies. *Eye* 25:113-118

Vrabec, T. R., Avinash, T., Edwards, A., Frost, A. & Donoso, L. A. (2003) Autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy: identification of a new family with a mutation in the ELOVL4 gene. *American Journal of Ophthalmology*, 136(3):542-45

Welsch, U. (2003) Lehrbuch Histologie. *Urban & Fischer Verlag München*, Jena, 1. Auflage

Yardley, J., Leroy, B. P., Hart-Holden, N., Lafaut, B. A., Loeys, B., Messiaen, L. M., Perveen, R., Reddy, M. A., Bhattacharya, S. S., Traboulsi, E., Baralle, D., De Laey, J.-J., Puech, B., Kestelyn, P., Moore, A. T., Manson, F. D. C. & Black, G. C. M. (2004) Mutations of VMD2 splicing regulators cause nanophthalmos and autosomal dominant vitreoretinopathopathy (ADVIRC). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45:3683-89

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Absorption
A	Adenosin
AAP	Antarctic Alkaline Phosphatase
Abb.	Abbildung
ADVIRC	autosomal dominante Vitreoretinochoroidopathie
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare (base pairs)
C	Cytosin
C	Konzentration
cDNA	Copy DNA
d	Schichtdicke
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EOG	Elektrookulogramm
ERG	Elektroretinogramm
ESE	exonic splice enhancer
ESS	exonic splice silencer
FCS	Fötales Rinderserum (fetal calve serum)
F	forward
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde(n) (hour)
ISE	intronic splice enhancer
ISS	intronic splice silencer
kb	Kilobasen
LA	linkes Auge
LPS	Lipopolysacharid
M	Molar

m	Milli
mfERG	Multifokales Elektroretinogramm
min	Minute(n)
mRNA	Messenger RNA
n	Nano
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
R	reverse
RA	rechtes Auge
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	retinales Pigmentepithel
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
sec	Sekunden
snRP	small nuclear ribonucleoproteins
SR-Proteine	Serin/Arginin-reiche Proteine
Taq	Thermus aquaticus
T	Thymin
ÜN	Über Nacht
v/v	volume to volume
w/v	weights per volume
ϵ	Extinktionskoeffizient
μ	Mikro

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	<i>Splice sites</i> und cis-Elemente.....	7
Abb. 2:	pSPL3- <i>Exon-trapping</i> -Vektor.....	8
Abb. 3:	Mögliche Spleißvarianten.....	9
Abb. 4:	cDNA ABCA4 Exon 25	35
Abb. 5:	cDNA ABCA4 Exon 3.....	36
Abb. 6:	cDNA ABCA4 Exon 43-44.....	37
Abb. 7:	cDNA ABCA4 Exon 40	38
Abb. 8:	cDNA ABCA4 Exon 8.....	39
Abb. 9:	cDNA ABCA4 Exon 10	40
Abb. 10:	cDNA ABCA4 Exon 9.....	41
Abb. 11:	Spleißvarianten VMD2 Exon 4	46
Abb. 12:	cDNA VMD2 Exon 4.....	46
Abb. 13:	ESEfinder-Analyse	48
Abb. 14:	Schema von Bestrophin-1	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Organismen und Zellen	11
Tabelle 2:	Primer	12
Tabelle 3:	Plasmide	13
Tabelle 4:	Enzyme	13
Tabelle 5:	Chemikalien	14
Tabelle 6:	Kits	15
Tabelle 7:	Medien.....	15
Tabelle 8:	Puffer und Lösungen.....	15
Tabelle 9:	Verbrauchsmaterialien	16
Tabelle 10:	Geräte.....	17
Tabelle 11:	Software	18
Tabelle 12:	Mutationen im ABCA4-Gen.....	35
Tabelle 13:	Übersicht über Ergebnisse für ABCA4-Mutationen.....	43
Tabelle 14:	Mutationen in Exon 4 des VMD2-Gens.....	44
Tabelle 15:	VMD2-Mutationen und Aminosäurepositionen	45
Tabelle 16:	ESEfinder-Ergebnisse.....	49

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernhard Weber danke ich für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu dürfen. Seine stete Diskussionsbereitschaft, Unterstützung und nicht zuletzt die gewährte Freiheit bei der experimentellen Durchführung trugen maßgeblich zum Gelingen bei.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Britta Fiebig für die ausdauernde und hervorragende Betreuung. Ihre Hilfe, Motivation und ihr Engagement ermöglichten zügiges Vorankommen und erhielten die Freude am wissenschaftlichen Arbeiten.

Danken möchte ich auch dem gesamten Team des Institutes, das immer ein offenes Ohr für meine Anliegen und Fragen hatte und so das Arbeiten erleichterte und den Laboralltag bereicherte.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir all dies erst ermöglichten, bei meinen Freunden und der alten WG für die nötige Abwechslung, bei Florian für die ganze Zeit.